



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Descripción de cambios transcripcionales durante
estadios tempranos del desarrollo del lenguado**

Paralichthys adspersus

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Eduardo Fabio APARI COSSIO

ASESOR

Mg. Giovanna Elizabeth SOTIL CAYCHO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Apari, E. (2019). *Descripción de cambios transcripcionales durante estadios tempranos del desarrollo del lenguado *Paralichthys adspersus**. Tesis para optar el título profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 15:25 horas del 17 de diciembre de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **EDUARDO FABIO APARI COSSIO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 021-EPGB-2019, el titulando expuso su tesis: **“DESCRIPCIÓN DE CAMBIOS TRANSCRIPCIONALES DURANTE ESTADIOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO DEL LENGUADO *Paralichthys adspersus*”** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: ... APROBADO CON MÉRITOS HONORES ...

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **EDUARDO FABIO APARI COSSIO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 16:40 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 17 de diciembre de 2019.

Dr. DAN VIVAS RUIZ
(PRESIDENTE)

Mg. GIOVANNA SOTIL CAYCHO
(ASESORA)

Blgo. MIGUEL NEIRA GONZALES
(MIEMBRO)

Dr. JORGE RAMIREZ MALAVER
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A mis padres por todo el apoyo, comprensión y amor que me dieron en todos los años, gracias por estar conmigo siempre y por confiar en mí.

A Dios por haberme dado la fuerza que siempre necesité y por ayudarme cada vez que las situaciones se ponían difícil, gracias padre celestial.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora Mg. Giovanna Elizabeth Sotil Caycho por la gran oportunidad, por su apoyo y por su confianza. Agradezco por cada consejo y por cada experiencia contada, ya que estás han ayudado a mi formación profesional. Muchas gracias por todo.

Al Instituto del Mar del Perú (IMARPE), por ser la institución donde realicé mi tesis, por haberme brindando tanto sus instalaciones como equipos para llevar a cabo este trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Genética Molecular del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), por haberme acogido estos meses y brindado las facilidades de equipos tanto para la parte experimental como para la redacción de mi tesis.

A mis compañeros de laboratorio, Marcos Espinel, Deivis Cueva y Paul Guarnizo, por haberme ayudado en este proceso con su guía y consejos, que enriquecieron este trabajo de investigación.

A mis mejores amigos de promoción, Mario Taira, César Bejarano, Diana Cubas, Sofia Pareja, Salyoc Tapia y Eduardo Sánchez, con los cuales compartí mil y una aventura (viajes, amanecidas, fiestas, etc.) y siempre estuvieron para apoyarme en las buenas y en las malas, los quiero mucho.

A mis amigos del Bloque Perú, Giovanni Trujillo, Willian Pinto, Martín Colán y Misael Fajardo y Hans Minaya por su gran apoyo y amistad, siempre nos hemos mantenido juntos y formado una familia.

A los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas que aportaron con sus conocimientos, además de sus historias y consejos, a mi formación profesional.

A mi familia, por siempre creer en mí, por ser siempre una gran alegría y por apoyar cada una de las decisiones en mi vida; en especial a mi mamá Laura (mi bisabuela) y mi mamá Lina (mi abuela) por sus cariños incondicionales y por siempre

Al Consejo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (CONCYTEC), por el financiamiento al proyecto que hizo posible que desarrolle este estudio.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
RNA-Seq	RNA Sequencing (Secuenciación del ARN)
DTE	<i>Differential Transcript Expression</i> (Expresión Transcripcional Diferencial)
dpe	Días post eclosión
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FONDEPES	Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero
GO	<i>Gene Ontology</i> (Ontología de genes)
IMARPE	Instituto del Mar del Perú
MINPRO	Ministerio de la Producción
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
1. RESUMEN	v
2. ABSTRACT	vii
3. INTRODUCCIÓN	1
4.1. Aspectos biológicos del lenguado fino <i>Paralichthys adspersus</i>	5
4.1.1. Taxonomía, morfología y distribución	5
4.1.2. Reproducción	7
4.1.3. Desarrollo y crecimiento	8
4.1.4. Manejo de <i>P. adspersus</i> bajo condiciones de confinamiento	11
4.1.5. Genes de importancia en el desarrollo y crecimiento de peces planos	13
5. OBJETIVOS	16
5.1. Objetivo general	16
5.2. Objetivos específicos	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1. Mapeo de lecturas y construcción de supertranscriptos	17
6.2. Análisis de DTE	18
6.3. Anotación funcional y enriquecimiento por ontología de genes	19
7. RESULTADOS	21

7.1. Procesamiento y mapeo de lecturas de secuencias.....	21
7.2. DTE	24
7.3. Anotación de transcritos y enriquecimiento por ontología de genes...	26
7.3.1. Caracterización e identificación de genes relacionados al desarrollo	40
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES.....	53
10. REFERENCIAS	54
11. ANEXO	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cronología del desarrollo de larvas de <i>P. adspersus</i>	(10)
Tabla 2. Cronología del crecimiento en la etapa pre-engorde de <i>P. adspersus</i>	(11)
Tabla 3. Resumen de las lecturas de secuenciación y lecturas procesadas del ARN total de <i>Paralichthys adspersus</i>	(21)
Tabla 4. Estadísticos de la construcción de supertranscriptos por TRINITY	(23)
Tabla 5. Mapeo de secuencias realizado con el programa STAR.....	(23)
Tabla 6. Mapeo de secuencias realizado con el programa Kallisto.....	(23)
Tabla 7. Transcriptos sobreexpresados en cada uno de los estadios realizando comparaciones por pares	(25)
Tabla 8. Transcriptos sobreexpresados en cada estadio.....	(28)
Tabla 9. Lista de resumen de las categorías ontológicas en el estadio de 3 dpe de <i>P. adspersus</i>	(33)
Tabla 10. Lista de resumen de las categorías ontológicas en el estadio de 60 dpe de <i>P. adspersus</i>	(35)
Tabla 11. Lista de niveles ontológicos con diferencia significativa de de las categorías ontológicas en la comparación entre los estadios 3 dpe y 60 dpe de <i>P. adspersus</i>	(36)
Tabla 12. Resumen de la caracterización de genes correspondientes a cada estadio de desarrollo temprano.....	(41)
Tabla 13. Resumen de identificación de genes relacionados con el desarrollo correspondiente a cada estadio.....	(41)
Tabla 14. Lista de genes anotados relacionados al desarrollo en el estadio de 3 dpe.....	(42)
Tabla 15. Lista de genes anotados relacionados al desarrollo en el estadio de 60 dpe.....	(46)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lenguado fino <i>Paralichthys adspersus</i>	(6)
Figura 2. Estadios temprano de desarrollo de <i>P. adspersus</i>	(9)
Figura 3. Crecimiento y supervivencia larval de <i>P. adspersus</i>	(9)
Figura 4. Gráficas de calidad de las lecturas generadas por RNA-Seq de ejemplares en los estadios 3, 40 y 60 dpe.....	(22)
Figura 5. <i>Heatmap</i> de la expresión de transcritos en los 3 estadios.....	(25)
Figura 6. Diagrama de transcritos sobreexpresados en cada estadio en comparación de los otros dos	(27)
Figura 7. Histograma de las categorías ontológicas de los 3 estadios de <i>P. adspersus</i>	(32)
Figura 8. Porcentaje de las diferentes categorías ontológicas en cada estadio.....	(33)
Figura 9. Histograma de los niveles ontológicos con diferencias significativas entre los estadios de 3 y 60 dpe.....	(37)
Figura 10. Histograma de la comparación de las cantidades y porcentajes de genes involucrados en los niveles ontológicos con diferencia significativa de las 3 categorías ontológicas entre los diferentes estadios	(39)
Figura 11. Gráficas de <i>Volcano plot</i> de cada una de las comparaciones por pares de los estadios temprano de desarrollo	(61)

1. RESUMEN

El lenguado fino *Paralichthys adspersus* es una especie altamente cotizada tanto en el mercado nacional como internacional, debido al alto valor nutricional de su carne; sin embargo, su cultivo en cautiverio aún presenta problemas durante los primeros estadios de desarrollo dadas por una alta tasa de mortalidad en larvas y anormalidades en su desarrollo, afectando considerablemente tanto la cantidad como la calidad de su producción. Es por ello que la presente tesis tuvo por objetivo describir los cambios transcripcionales ocurridos durante los estadios tempranos del desarrollo de *P. adpsersus* con el fin de identificar genes involucrados en su desarrollo normal. Así a partir de secuenciación del ARN de individuos pre-metamórficos (3 días post eclosión, dpe), metamórficos (40 dpe) y post-metamórficos (60 dpe), y obtención de supertranscriptomas, se realizó el análisis de expresión diferencial de transcriptos para seleccionar aquellos sobreexpresados en cada estadio. Se observó un perfil de expresión similar entre estadios de desarrollo de 40 y 60 dpe, mientras que para 3 dpe ocurren procesos de sobreexpresión y subexpresión génica. Por otro lado, el mayor número de transcriptos sobreexpresados se registró, en la comparación por pares, en la etapa pre-metamórfica de 3 dpe (n=344), seguido por la etapa de post metamorfosis a 60 dpe (n=144), y la de menor número durante la etapa final de la metamorfosis a 40 dpe ($p < 0.001$, fold change = 4); mientras que el mayor número de términos ontológicos se obtuvo a partir de transcriptos obtenidos durante larvas de 3 dpe (n=429), seguido por 60 dpe (n=120), y el menor número durante 40 dpe (n=2). Finalmente, se registraron 33, 0 y 2 genes relacionados con el desarrollo en los individuos de 3, 40 y 60 dpe respectivamente, los cuales estarían involucrados en la formación del sistema nervioso, sistema óseo, sistema circulatorio, tejido cardíaco, tejido pancreático, tejido muscular, diferenciación de células epiteliales, hematopoyesis, vías de señalización, etc. La lista de genes reportada en esta tesis podría servir como posibles marcadores para realizar monitoreo durante desarrollo de *P. adspersus*, disminuyendo así, la alta tasa de

mortalidad de larvas debido a fallos en la formación de órganos vitales y anormalidades en el desarrollo que afectaría a la calidad de la producción.

Palabras claves: Lenguado, *Paralichthys adspersus*, estadios tempranos del desarrollo, RNA-Seq, transcriptoma.

2. ABSTRACT

The fine flounder *Paralichthys adspersus* is a highly valued species both in the national and international market, due to the high nutritional value of its meat; nevertheless, in captivity it still presents problems during the first stages of development due to a high mortality rate in larvae and abnormalities in its development, considerably affecting both the quantity and the quality of its production. So, the present study aimed to describe the transcriptional changes occurred during the early stages of the development of *P. adspersus* in order to identify genes involved during normal development. From total RNA sequencing of pre-metamorphic (3 days post hatching, dph), metamorphic (40 dph) and post-metamorphic (60 dph) organisms, we performed the differential transcript expression analysis to obtain supertranscriptoms and to select those overexpressed in each stage. A similar expression profile was observed between developmental stages of 40 and 60 dph, while for 3 dph processes of overexpression and subexpression of genes occurred. On the other hand, the highest number of overexpressed transcripts was recorded, in pairs, in the pre-metamorphic stage of 3 dpe (n=344), followed by the post-metamorphosis stage at 60 dpe (n=144), and the one with the lowest number during the final stage of metamorphosis at 40 dpe ($p<0.001$, fold change=4); while the highest number of ontological terms was obtained from transcripts during larvae of 3 dpe (n=429), followed by 60 dpe (n=120), and the lowest number during 40 dpe (n=2). Finally, 33, 0 and 2 genes related to development were recorded in individuals of 3, 40 and 60 dph respectively, which would be involved in the formation of the nervous system, bone system, circulatory system, heart tissue, pancreatic tissue, tissue muscle, epithelial cell differentiation, hematopoiesis, signaling pathways, etc. The list of genes reported in this study could be used as possible markers for monitoring development of *P. adspersus*, looking for reducing the high rate of larval mortality due to failures in the formation of vital organs and developmental abnormalities that would affect the quality of the production.

Keywords: Fine flounder, *Paralichthys adspersus*, early stages of development, RNA-Seq, transcriptome.

3. INTRODUCCIÓN

Los pleuronectiformes son un orden de peces planos comúnmente marinos, con una amplia distribución mundial y de características únicas entre los vertebrados (morfología plana y distribución corporal asimétrica). Estos peces, como el lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* (Temminck y Schlegel, 1846), el rodaballo *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758) y el lenguado fino *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867), son bien cotizados a nivel internacional debido al alto valor nutricional de su carne blanca; sin embargo, su producción a través de la acuicultura es ínfima en comparación con otros recursos hidrobiológicos o inclusive con la producción obtenida por pesca de captura (Cerdeira y Machado, 2013; Gibson et al., 2014).

En la actualidad, la acuicultura es considerada como una de las actividades más importantes de producción de alimentos a nivel mundial, tanto para consumo humano directo como para otros fines (47% del total de producción pesquera del 2016 corresponde a 171 millones de toneladas). Además, el consumo per cápita de pescado comestible aumentó de 9.0 a 20.2 kg, del año 1961 al 2015, a una tasa media aproximada de 1.5% por año (FAO, 2018). A nivel mundial, si bien la producción acuícola de peces planos ha aumentado considerablemente (26 300 toneladas a 148 800 toneladas, del año 2000 al 2008), estas cifras no alcanzan el 1% del total de la producción pesquera por acuicultura, así como tampoco a nivel nacional (3.16 toneladas), en comparación con la pesca de captura (369 toneladas) de estos peces (FAO, 2011; MINPRO, 2017; FAO, 2018).

Según el Ministerio de Producción del Perú (PRODUCE), el precio del lenguado en los mercados mayoristas nacionales alcanzó los S/ 33.6 por kg en el año 2017, con un promedio de S/ 30.7 por kg desde el 2013 al 2017, convirtiéndose en el pescado más costoso en el mercado interno. Con respecto a las exportaciones del lenguado, el

principal mercado es China que adquirió, en el 2017, 10 520 kg de congelado, por \$ 29 456 en divisas, considerándose como el pico más grande e importante de exportación de este recurso hidrobiológico. Sin embargo, grandes cantidades de otras clases de peces planos se importan a Perú, proveniente de países como China (233 938 kg desde el 2014 al 2016, de *S. maximus*, *P. olivaceus* y *Cynoglossus semilaevis*), Ecuador (42 600 kg desde el 2012 al 2017, con el lenguado *Paralichthys woolmani*) y Argentina (35 532 kg desde el 2002 al 2015, con el lenguado *Paralichthys orbignyanus*), lo que evidencia una demanda superior a la oferta interna (INFOPES, 2018).

Tanto el Plan Nacional Acuícola (vigente desde el 2010 al 2021) como el Programa Nacional de Ciencia, Desarrollo Tecnológico e Innovación en Acuicultura (2013 al 2021), implementados por PRODUCE, califican a *P. adspersus* como una especie prioritaria y con alto potencial para la diversificación de la acuicultura marina, buscando revalorizar a los recursos hidrobiológicos propios en lugar de optar por la introducción de especies exógenas. En este sentido, el Plan Nacional impulsa el cultivo del lenguado en diferentes regiones del Perú, dados los diversos climas y grandes extensiones de espejos de agua propicios para la actividad acuícola marina; mientras que el Programa Nacional prioriza la investigación en el mejoramiento de su cultivo para una mayor producción (PRODUCE, 2009; PRODUCE, 2013).

P. adspersus, pese a tener amplios rangos de tolerancia térmica a lo largo de su distribución geográfica (desde el norte del Perú hasta sur del Chile) y de reflejar una gran adaptabilidad, no es aprovechado de manera efectiva en la acuicultura (FONDEPES, 2015). Según PRODUCE, la mayor producción acuícola se da en el departamento de Ancash (3.07 toneladas de un total de 3.16 toneladas en el 2016), aunque con escasos centros de cultivos. Además, una de las principales dificultades que enfrenta el cultivo del lenguado en el Perú, es el elevado costo en su producción (FONDEPES, 2015).

En la última década, se han desplegado grandes esfuerzos para el desarrollo de la tecnología integral de su cultivo (manejo de reproductores, desoves, cultivos desde larva a juveniles y engorde). Si bien es corto el tiempo que tiene el cultivo de esta especie en nuestro país, en comparación con otras especies (Barboza et al., 2017), también es importante considerar que existen problemas en el cultivo de peces planos en general, presentándose la mayoría durante los primeros estadios de desarrollo, como: i) alta mortalidad de larvas (entre el 50-70% durante los primeros 20 días post eclosión (dpe), dependiendo de la especie), por lo que es considerado como uno de los periodos críticos del desarrollo, ii) anomalías en el desarrollo, como falla en la migración del ojo durante la metamorfosis, deformidades esqueléticas y problemas de pigmentación, que si bien no afectan la supervivencia del pez, sí disminuyen su valor comercial. Sumado a esto, las mejoras en el manejo del recurso se ven limitado por el escaso conocimiento de su biología y de aspectos genéticos en particular. Así, no existen estudios desde una perspectiva genética que aborden estos problemas, limitados en parte por la falta de genomas de referencia, y el desconocimiento de genes asociados a caracteres de interés en acuicultura, como nutrición, respuesta inmune, crecimiento, entre otros (Venizelos y Benetti, 1999; Chambers et al., 2001; Power et al., 2008; Silva y Oliva, 2010).

Las tecnologías de la secuenciación de la última generación (NGS, por sus siglas en inglés) como la secuenciación masiva del ARN (RNA-Seq), vienen ofreciendo nuevas alternativas para el estudio de peces planos, permitiendo la obtención de marcadores moleculares aplicados a la selección de organismos con características favorables a nivel productivo. Esto resulta ideal cuando se trabaja con organismos no modelos, es decir cuando no se tiene un genoma de referencia para la especie, requiriendo además de una ínfima cantidad de muestra, y otorgando una mayor precisión y sensibilidad en comparación a otras técnicas (Wang et al., 2009). En la actualidad, diversos estudios

utilizando RNA-Seq están enfocados en diferentes aspectos biológicos en peces planos, sentando las bases para futuros estudios aplicativos. Así por ejemplo, Alves et al. (2016) realizaron estudios para el descubrimiento de genes relacionados a la metamorfosis y regulados por hormonas tiroideas en *Hippoglossus hippoglossus*; Wang et al. (2019) reportaron genes relacionados con la pigmentación en lenguado *P. olivaceus* tratados con diferentes tipos de hormonas tiroideas; Louro et al. (2019) estudiaron los genes relacionados al desarrollo de *Solea senegalensis*; mientras que Méndez et al. (2019) reportaron genes relacionados con el crecimiento del lenguado *P. adspersus* sometidos a una condición específica llamada crecimiento compensatorio.

En este sentido en la presente tesis, a partir de una comparación de transcriptomas de *P. adspersus* en etapas de pre-, durante y post- metamorfosis, se buscó describir los cambios transcripcionales que ocurren durante estadios tempranos de su desarrollo. Con ello, se lograron identificar genes con expresión diferencial entre estadios, así como aquellos asociados al desarrollo. El conocimiento de estos genes y su perfil de expresión brindará la base para la generación de posibles paneles de marcadores que puedan ser considerados en planes de monitoreo integrales, complementando al control fenotípico que se aplica durante su cultivo. Esto contribuirá al conocimiento de genes asociados a procesos fisiológicos importantes durante etapas iniciales del desarrollo, además de aportar en nuevas estrategias para su manejo y selección y, como consecuencia, mejorar la cantidad y calidad de su producción.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Aspectos biológicos del lenguado fino *Paralichthys adspersus*

4.1.1. Taxonomía, morfología y distribución

P. adspersus es una especie endémica de las costas de Perú y Chile que pertenece al orden Pleuronectiformes, en el cual se encuentran diferentes familias como *Achiridae*, *Bothidae*, *Cynoglossidae*, *Soleidae*, *Scophthalmidae*, *Pleuronectidae* y *Paralichthyidae* (Belén et al., 2005; Silva y Oliva, 2010). En esta última, se ubica el género *Paralichthys* conformado por 17 especies distribuidas en ambas costas de América (Silva y Oliva, 2010). En el Perú, *P. adspersus* es la única especie de este género registrada con una gran importancia económica, presentando la siguiente posición taxonómica (según la base de datos FISHBASE):

- Reino: Animalia
- Filo: Chordata
- Clase: Actinopterygii
- Orden: Pleuronectiformes
- Suborden: Pleuronectoidei
- Familia: Paralichthyidae
- Género: Paralichthys
- Especie: *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867)
- Nombre común: Lenguado fino



Figura 1. Lenguado fino *Paralichthys adspersus* de la localidad de Casma, Perú (Fuente: FISHBASE, 2018).

P. adspersus presenta un cuerpo alto y elíptico, con dos lados diferentes: el ocular con escamas ctenoides (parte pigmentada, de color gris a gris marrón con manchas oscuras), y el lado ciego con escamas cicloides (parte sin pigmentación). También presenta una línea lateral fuertemente curvada en su porción inicial que continúa casi en línea recta hacia la región posterior. Posee una cabeza grande con el perfil casi recto, un hocico grande (un poco más grande que el diámetro del ojo) y oblicuo, y branquiespinas cortas. Las narinas ubicadas en la cara oculada son de pequeño tamaño y están situadas una al lado de la otra cercanas al perfil de la cabeza, similar a las narinas de la cara ciega. Cuenta con aletas dorsales alargadas que se originan a nivel de la mitad del ojo en los ejemplares adultos, aletas pectorales cortas cuya longitud corresponde casi a la mitad de la longitud de la cabeza en el lado oculado y casi un tercio de la longitud de la cabeza sobre el lado ciego; y aletas pélvicas en ambos lados subiguales (Kong y Castro, 2002).

Su distribución se registra desde la localidad de Paita en el departamento de Piura, en Perú, hasta el golfo de Arauco incluyendo el archipiélago de Juan Fernández en la región de Valparaíso en Chile (Silva y Oliva, 2010; Medina, 2016). Su hábitat común son los golfos y las bahías someras, donde buscan protección frente a depredadores, temperaturas óptimas y alta disponibilidad de alimento (Silva y Oliva, 2010).

4.1.2. Reproducción

La proporción sexual en esta especie es de un macho por cada tres hembras (Samamé & Castañeda, 1998). Se estima que alcanza la primera madurez sexual a los 21 meses post eclosión, cuando tiene aproximadamente 24 cm de longitud total y 220 g de peso (Silva, 2010). No existe un dimorfismo sexual marcado, salvo durante el proceso de maduración sexual donde las hembras muestran un vientre abultado fácilmente observable, mientras que los machos liberan el semen al ser manipulados. Ángeles & Mendo (2005) reportan la presencia de un orificio genital en hembras sobre la línea media detrás del ano, inexistente en machos, lo que permitiría discriminarlos. Además, Samamé & Castañeda (1998) reportan dimorfismo sexual por tallas en esta especie que se acentúa a partir de los 4 años, siendo las hembras (máximo de 84 cm) de mayor tamaño respecto a los machos (máximo de 57 cm) en condiciones naturales.

La reproducción del lenguado se da con más frecuencia en las estaciones de primavera-verano, es decir entre octubre y febrero; y la fecundidad total promedio que se estima es de 2 125 000 huevos por kg, con un promedio de 1 500 huevos por gramo de pez (Ángeles y Mendo, 2005). Las hembras presentan ovarios de gran tamaño y ocupan hasta la región caudal del cuerpo.

Los ovocitos maduros pueden llegar a alcanzar un tamaño de diámetro entre 0.66 y 0.80 mm; poseen desove parcial o fraccionado, con presencia de ovocitos en diferentes estados de desarrollo durante la mayor parte del año. La mayor intensidad del desove se presenta desde fines de invierno a inicios de primavera (Acuña y Cid, 1995). Sin embargo, es posible inducir a ovulación y desove espontáneo mediante regulación hormonal (GCH o acetato de buserelina), temperatura del agua, fotoperiodo, o manteniendo las condiciones naturales (Hurtado, 2009).

4.1.3. Desarrollo y crecimiento

4.1.3.1. Desarrollo embrionario y larval

Los primeros estadios de desarrollo embrionario desde blástula (7 h 20 min), gástrula (20 h), néurula (26 h) a embrión (52 h), terminan cuando ocurre la eclosión del huevo que se produce entre las 54 y 62 horas post fecundación, dependiendo de la temperatura de incubación que puede oscilar entre 15 a 16 °C (Silva, 2001; Hurtado, 2009).

Posteriormente, la etapa de pre-larva comprende desde la eclosión hasta la reabsorción del saco vitelino. Los individuos son de 1.9 mm de longitud total promedio, escasamente desarrollados, y con un abultado saco vitelino (Fig. 2a) (Silva y Flores, 1989; Hurtado, 2009, Silva y Oliva, 2010, FONDEPES, 2015). La reabsorción del saco vitelino ocurre entre las 48 a 72 horas post eclosión, dependiendo de la temperatura del agua (Silva, 1997). Es en la etapa de post-larva donde ocurre la reabsorción del saco vitelino hasta el inicio de la metamorfosis, los ejemplares alcanzan tamaños iniciales de 3.5 a 3.7 mm a los 3 a 4 dpe, con un sistema digestivo y ojos desarrollados (Fig. 2b), comienza la alimentación externa y es la etapa donde se presenta la

mayor mortalidad (Fig. 3) (Hurtado, 2009; Silva y Oliva, 2010; FONDEPES, 2015).

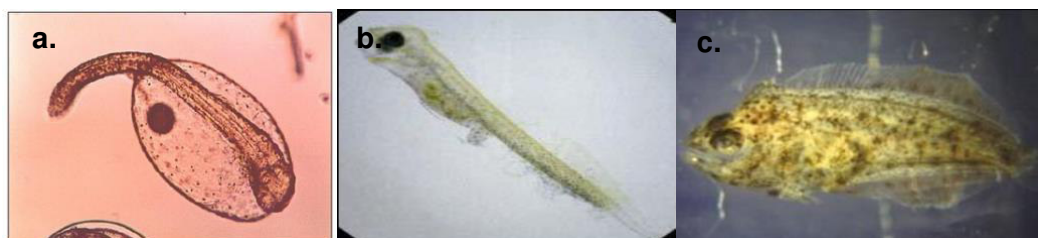


Figura 2. Estadios tempranos del desarrollo de *Paralichthys adspersus* durante (a) pre – larva, (b) larva de 3 dpe, y (c) larva de en proceso de metamorfosis (Fuente: Hurtado, 2009).

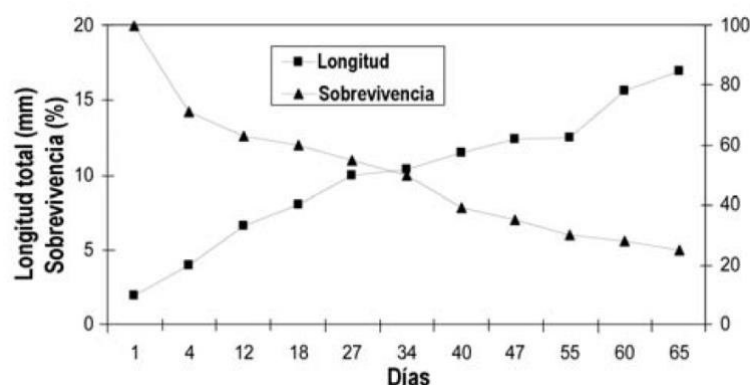


Figura 3. Crecimiento y supervivencia larval de *Paralichthys adspersus* durante 65 dpe (Fuente: Silva, 2001).

Según Silva (2000), la metamorfosis comienza entre los 27 y 35 dpe y cuando las post-larvas alcanzan un tamaño entre 9.7 y 10.5 mm (Fig. 2c). En esta etapa, se produce un cambio de una simetría bilateral corporal a una distribución asimétrica. Aproximadamente a los 60 dpe, se da el término de la metamorfosis donde se observan los rasgos característicos de un individuo adulto, como ubicación de los ojos al lado izquierdo y el lado ciego

se encuentra totalmente desarrollado. Según Silva & Flores (1989), los tamaños pueden variar entre 13.5 a 18 mm (Tabla 1, Fig. 3).

Tabla 1. Cronología del desarrollo larval de *Paralichthys adspersus* en laboratorio, a un rango de temperatura de 13 a 17 °C (Fuente: Hurtado, 2009).

Estado	Edad (dpe)	Longitud (mm)
Pre – larva	1	3.0
Inició de alimentación	2	3.4
Pre – flexión	18	5.8
Flexión	28	8.0
Post – flexión	40	12.0
Fin de la metamorfosis	52	17.0
	60	18.0 a 20.0

4.1.3.2. Crecimiento juvenil y adulto

Al término de la metamorfosis, cuando las larvas poseen todas las características del adulto se inicia la etapa juvenil, donde los organismos permanecen en el fondo sobre su lado ciego y su actividad natatoria es menos activa. Esta etapa coincide con el periodo de destete que comienza aproximadamente entre los 55 a 60 dpe, dado por el reemplazo progresivo del alimento vivo al inerte, en un periodo de 10 a 15 días (Hurtado, 2009; Orihuela, 2015). Una vez adaptados los peces a este cambio de dieta, se comienza la etapa de pre-engorde o *nursery* con el objetivo de obtener el lenguado de tamaño y peso propicios (10 – 20 g), para luego iniciar la etapa de crecimiento o engorde (Tabla 2) (Hurtado, 2009; Silva, 2010). Es en esta última etapa donde se busca que el pez alcance un tamaño comercial.

Hurtado (2009) considera que el peso mínimo comercial del lenguado *P. olivaceus* en Asia (250 g) se consigue a los 1.5 - 2 años de cultivo, mientras que el peso máximo (de 1 kg) se consigue a los 3 años de cultivo entre 15 a 17 °C. PRODUCE (2019) considera como tamaño comercial para *P. adspersus*, a ejemplares de 25 a 35 cm, y como peso comercial de 0.3 a 1 kg.

Tabla 2. Cronología del crecimiento en la etapa pre-engorde o *nursery* de *Paralichthys adspersus*, entre 15 y 18 °C (Fuente: Silva, 2010).

Edad (dpe)	Longitud (cm)	Peso (g)	Densidad (kg.m ⁻²)
90	3.1	0.4	0.3
120	6.3	3.3	0.3
150	7.1	5.2	0.5
180	8.9	9.5	1.0
210	9.6	11.5	1.1

4.1.4. Manejo de *P. adspersus* bajo condiciones de confinamiento

El primer estudio correspondiente al cultivo bajo condiciones de laboratorio de *P. adspersus* fue publicado por Silva y Flores (1989) en Chile, donde describen su crecimiento y desarrollo larval, que posteriormente fue considerado como información preliminar para su cultivo a nivel piloto; mientras que en el Perú, el primer reporte ocurrió en el año 1997 (FONDEPES, 2015). Investigaciones desarrolladas en esta especie generalmente giran en torno a 2 ejes: el cultivo con mejoramiento de las condiciones y problemas relacionados al cultivo; y aspectos biológicos como inmunológicos, fisiológicos, genéticos, etc.

Con respecto a la mejora de las condiciones de cultivo del lenguado fino, diversas estrategias han sido probadas con el fin de aumentar su producción y reducir su alta tasa de mortalidad. Piaget et al. (2007) comprobaron el efecto positivo de la aplicación de β -glucanos y manano-oligosacáridos sobre el crecimiento y la supervivencia en un sistema intensivo de cría de larvas, reduciendo los efectos de estrés fisiológico y el daño físico causado por la actividad acuícola; Wilson (2009) comprobó el efecto positivo de la complementación del alimento con ácido graso altamente insaturado n-3 en los reproductores sobre la calidad de sus huevos (cantidad de huevos flotantes, fertilización, escisiones celulares normales, tasa de eclosión) y larvas (presencia de larvas normales), aumentando la probabilidad de supervivencia en los primeros estadios de vida; por último, Orihuela (2015) comprobó los efectos positivos del alimento experimental producido por el proceso de *Particle Assisted Rotational Agglomeration* (PARA) en el crecimiento y supervivencia de larvas durante el destete, similares al del alimento comercial Otohime® que es considerado como el mejor para esta especie.

Los problemas que presenta el cultivo de *P. adspersus* son similares a los de la mayoría de los peces planos, diferenciándose entre otros en los agentes patógenos que pueden causar enfermedades. Castro y Burgos (1996) identificaron a través de microscopía electrónica al parásito llamado *Kudo thyrsithes* (*Myxozoa multivalvulida*) responsable de una condición lechosa en la musculatura del lenguado, ocasionando carne de mala calidad y disminuyendo su valor comercial; Medina et al. (2016) identificaron en ejemplares confinados y a través de marcadores moleculares y microscopía electrónica, al agente patógeno causante de la escuticociliatosis *Miamiensis*

avidus, condición que provoca daño en varios tejidos del cuerpo y la muerte de diversas especies marinas.

4.1.5. Genes de importancia en el desarrollo y crecimiento de peces planos

El gran avance de las técnicas usadas en el análisis de genomas, transcriptomas y proteomas ha permitido profundizar en el estudio de los diversos procesos que ocurren en peces planos, con el fin de mejorar su cultivo. Así por ejemplo, Figueras et al. (2016) a través de la secuenciación del genoma de rodaballo *S. maximus*, lograron asociar 1066 genes con el crecimiento, entre los cuales el factor miogénico 5 (*myf5*), factor miogénico 6 (*myf6*) y factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*igf1*) han sido utilizados para la selección asistida en otras especies acuícolas, así como también en ganado; Shao et al. (2017), a través de la secuenciación del genoma de lenguado japonés *P. olivaceus*, y la comparación de transcriptomas entre larvas premetamórficas, prometamórficas, en clímax de la metamorfosis y postmetamórficas reportaron una lista de genes relacionados con la morfología asimétrica característica de este orden de peces. Entre los genes con expresión diferencial (como: *gngt1*, *guca1a*, *grk1*, *rho*), mencionan que ocurre una regulación a través de las hormonas tiroideas, comprobando una vez más la importancia de estas hormonas en el normal desarrollo de peces planos.

Por otro lado, el RNA-seq se ha convertido en una de las herramientas más eficiente cuando se refiere al análisis de expresión diferencial de genes, debido a que al ser una técnica de alto rendimiento o *high-throughput*, permite conocer la expresión de un gran número de genes con alta precisión, además de una alta sensibilidad respecto a la detección de secuencias

nucleotídicas (Wang et al. 2009). Alves et al. (2016) reportaron para *H. hippoglossus* una lista de 145 genes (pertenecientes a la familia homebox, forehead, entre otros) relacionados con el proceso de metamorfosis, expresados diferencialmente en estadios larvales premetamórficos en comparación con juveniles, mencionando estar relacionados con hormonas tiroideas, cruciales en el crecimiento en diversas especies de peces; Wang et al. (2019) obtuvieron una lista de 146 genes relacionados con la pigmentación de ejemplares de lenguado japonés *P. olivaceus* tratados con diferentes hormonas tiroideas, sugiriendo su importancia en el proceso de pigmentación y normal desarrollo; Louro et al. (2019) obtuvieron una lista de 440 genes relacionados con el desarrollo del lenguado *S. senegalensis*, y regulados por hormonas tiroideas, comparando individuos larvales pre-metamórficos y juveniles, además mencionan que estos genes estarían relacionados con diferentes procesos biológicos como la producción de hormonas, procesamiento de proteínas, regulación del ciclo celular, etc.

Para *P. adspersus* aún son escasos los estudios basados en RNA-Seq. Así por ejemplo, solo se reporta el trabajo de Méndez et al. (2018) que tuvo como finalidad evaluar la respuesta del transcriptoma del músculo esquelético en un ensayo de crecimiento compensatorio donde se identificaron 109 y 117 transcriptos expresados diferencialmente en las condiciones de ayuno y re-alimentación, respectivamente. Los transcriptos sobreexpresados en ayuno se relacionaron con el catabolismo, mientras que los subexpresados con el proceso de biosíntesis de sustancia orgánica. En el caso de re-alimentación, se registraron, respectivamente, importantes transcriptos sobreexpresados y subexpresados para los procesos de la división nuclear mitótica y del sistema muscular. Sin embargo, no existen

trabajos relacionados a genes asociados al desarrollo de esta especie en sus primeros estadios.

Por otro lado, existen reportes de expresión génica en el lenguado fino, como el de Delgado et al. (2008) quienes comprobaron el rol fundamental del gen miostatina (MSTN) en el control del desarrollo de larvas somitas (específicamente en la formación de notocorda, somitas, intestino y alguna regiones de la cabeza) y en la regulación del crecimiento en juveniles, a través de su secuenciación y evaluación de expresión. Escobar et al. (2011) comprobaron que tanto el factor de crecimiento insulínico tipo 1 y su receptor (IGF-1 y IGR-1R) desempeñan un papel importante en el desarrollo de larvas (formación del sistema nervioso, muscular y estructuras óseas) y en el crecimiento de juveniles de *P. adspersus*. Por otro lado, Fuentes et al. (2012) mencionan que el aumento del nivel de leptina durante el ayuno tendría un rol importante en la estrategia de supervivencia pasiva de individuos que experimentan períodos de escasez de alimentos, al disminuir el apetito y limitar su actividad física, además de estar relacionado con el aumento del nivel de la hormona de crecimiento en juveniles, presentando un mayor tamaño en aquellos sometidos a ayuno que en individuos alimentados constantemente. Si bien, existen algunos estudios sobre la expresión génica en *P. adspersus*, estos siguen siendo escasos y aún no se comprenden muchos de los procesos fisiológicos en los que están involucrados, debido a que las técnicas utilizadas (monitoreo de genes de forma aislada) presentan limitaciones con respecto a la cantidad de genes regulados.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Describir los cambios transcripcionales ocurridos durante estadios tempranos del desarrollo del lenguado fino *Paralichthys adspersus*.

5.2. Objetivos específicos

- Comparar los transcriptomas de lenguado *P. adspersus* en estadios tempranos de desarrollo (3, 40 y 60 días post eclosión), y seleccionar los genes con expresión diferencial en cada estadio.
- Asignar la función a los genes expresados diferencialmente durante el desarrollo de *P. adspersus*.
- Identificar los genes expresados diferencialmente e implicados en el desarrollo del lenguado fino *P. adspersus*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Mapeo de lecturas y construcción de supertranscriptos

Para esta tesis, se utilizaron los datos obtenidos de la secuenciación del ARN de ejemplares enteros con 3, 40 y 60 dpe, obtenidos mediante la plataforma de Illumina HiSeq 2500, los que fueron proporcionados por el Laboratorio de Genética Molecular dentro del marco del Proyecto 194-2015-FONDECYT “Identificación de SNPs asociados al desarrollo y crecimiento de larvas y juveniles de *Paralichthys adspersus*, mediante la comparación de sus transcriptomas completos”.

Una vez obtenidas las lecturas de secuenciación o *reads*, se verificó su calidad utilizando el programa FastQC 0.11.8 (Andrews, 2010). A fin de tener resultados más precisos, las lecturas fueron procesadas eliminando los adaptadores de secuenciación, filtrando las secuencias de corta longitud (<25pb) y aquellas con baja calidad tanto en los extremos iniciales como finales (<5) utilizando el programa Trimmomatic V 0.32 (Boger et al., 2014). El ensamble del transcriptoma *de novo* (transcriptoma híbrido debido a que se construyó de los transcritos de los 3 estadios) y su respectiva anotación fueron realizados por los miembros del Laboratorio de Genética Molecular del IMARPE (datos no publicados).

A partir de los datos anteriormente mencionados, en este trabajo se procedió a procesar los transcritos para la construcción de los supertranscriptos utilizando el programa TRINITY 2.6.1d (Grabherr et al., 2011; Davidson et al., 2017); estos fueron utilizados como base para la cuantificación de la expresión de los genes en cada uno de los estadios. Luego, se realizó el

mapeo de las lecturas filtradas utilizando los programas STAR (Doblin et al., 2013) y Kallisto (Bray et al., 2016), y consecuentemente se realizó el conteo de las lecturas utilizando el programa featureCounts 1.6.3 (Liao et al., 2013) para obtener la matriz de expresión requerida en el análisis de expresión diferencial de transcritos (DTE).

Los supertranscriptos son secuencias construidas a partir de cualquier conjunto de transcritos, los cuales contendrán todos los exones de un gen sin redundancia. Estos son útiles cuando se trabajan organismos no modelos (no poseen un genoma de referencia y se opta por realizar ensamble *de novo*), ya que proporcionan un transcriptoma de referencia para estudiar diversos aspectos del gen, incluido el uso de transcripción diferencial (también conocido como uso de exones diferenciales) y como sustrato para el mapeo de lecturas e identificación de polimorfismo alélicos (Davidson et al, 2017). La construcción de los transcritos se puede realizar a partir de un programa de python llamado “Lace” (disponible en <https://github.com/Oshlack/Lace/wiki>) o sino a través del programa TRINITY (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki/SuperTranscripts>).

6.2. Análisis de DTE

Con el fin de conocer la cantidad de transcritos que se expresan diferencialmente en cada uno de los estadios, para el análisis de DTE se hicieron comparaciones por pares utilizando el paquete edge R del *software* de programación R (Robinson et al., 2010). Se obtuvo una lista de transcritos sobreexpresados (con un valor de *fold change* (FC) mayor a 4 y un valor *p-value* menor a 0.001) para cada estadio; además, se obtuvo gráficas *Volcano plot* para ver si existe significancia en la expresión

diferencial de los transcriptos. También, se realizó la comparación en la expresión de los transcriptos entre los diferentes estadios representado por gráficas *Heatmap* con el programa TRINITY 2.6.1d (Grabherr et al., 2011).

6.3. Anotación funcional y enriquecimiento por ontología de genes

Tanto la anotación funcional como el enriquecimiento por ontología de genes del transcriptoma de larvas de *P. adspersus* (individuos pre-metamórficos, metamórficos y post-metamórficos) fueron realizados los miembros del Laboratorio de Genética Molecular del IMARPE (datos no publicados), quienes generaron una tabla con la información de transcriptos anotados. Una vez finalizado el análisis DTE, se procedió a realizar la coincidencia entre las listas con transcriptos sobreexpresados de cada uno de los estadios de desarrollo con la lista de anotación, utilizando el paquete de R, *dyplr*. Se obtuvo una nueva lista de los transcriptos asociados a una proteína que definiría la función de dicho transcripto con un término ontológico que daría a conocer si este transcripto está involucrado en un proceso biológico, si tiene alguna función molecular o pertenece a algún componente celular. Además, se caracterizaron cada una de las categorías ontológicas y se obtuvieron gráficas sobre las mismas utilizando el servidor WEGO (Ye et al., 2006). Además, del mismo servidor, se extrajo la lista de genes relacionados con sus términos ontológicos para la caracterización de los genes.

Por último, se analizaron los términos ontológicos de la categoría de proceso biológico para identificar los genes relacionados con el desarrollo. Se realizó una minería de datos en todas las subcategorías de la categoría de proceso biológico para encontrar los genes relacionados al desarrollo de alguna

estructura de lenguaje, adicionalmente se realizó una minería de datos más exhaustiva en la subcategoría de *“Development”* (desarrollo).

7. RESULTADOS

7.1. Procesamiento y mapeo de lecturas de secuencias.

Se generaron 272 186 438 pares de lecturas por la secuenciación, teniendo 94 267 172, 83 154 761 y 94 764 505 pares de lecturas en los estadios de 3, 40 y 60 dpe, respectivamente. Al evaluar las secuencias generadas a través del programa FastQC 0.11.8, se observó que el puntaje promedio de calidad de cada uno de los segmentos de las lecturas fue mayor a 32, encontrándose en la zona verde o de gran calidad (Fig. 4). Posterior a la eliminación de los adaptadores, el filtrado de secuencias de corta longitud y con extremos de baja calidad, se obtuvieron finalmente 89 469 236, 76 637 51 y 90 075 009 pares de lecturas en los estadios de 3, 40 y 60 dpe, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de lecturas de secuenciación del ARN total de *Paralichthys adspersus* de estadios 3, 40 y 60 dpe.

Lecturas secuenciadas	Estadio			Total
	3 dpe	40 dpe	60 dpe	
Número de millones de pares de lecturas antes del filtrado	94.27	83.15	94.76	272.18
Número de millones pares de lecturas después del filtrado	89.47	76.64	90.07	256.18
Porcentaje de ambas lecturas sobrevivientes (%)	94.91	92.16	95.05	94.15

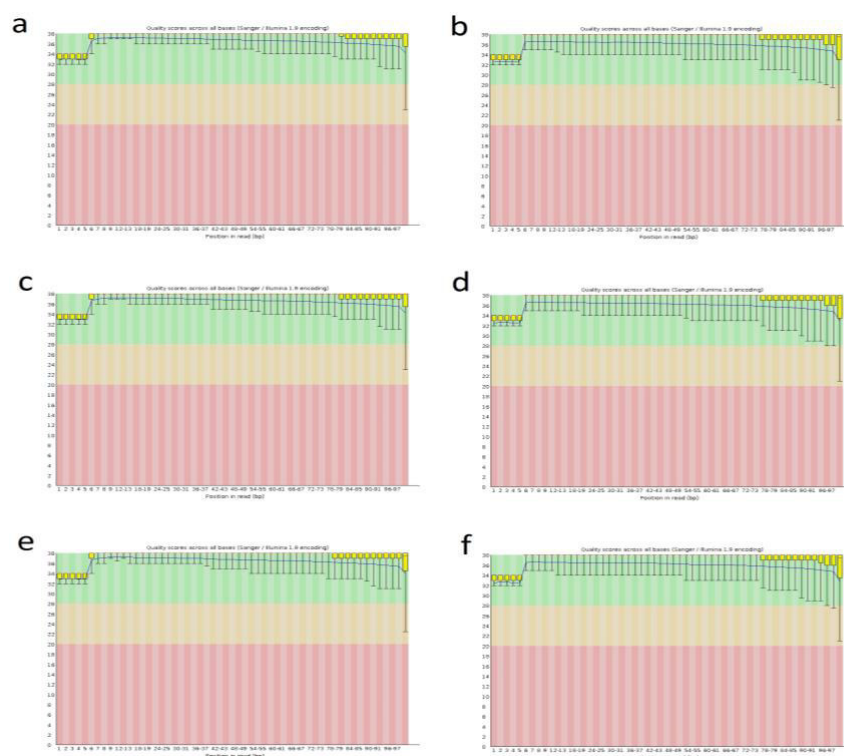


Figura 4. Gráficas de calidad de las lecturas generadas por RNA-Seq de ejemplares de 3 (a y b), 40 (c y d) y 60 (e y f) dpe (a,c,e: forward; b,d,f: reverse).

Se obtuvieron un total de 195 512 supertranscriptos contruidos a partir de las lecturas y el transcriptoma híbrido brindado por el Laboratorio de Genética Molecular del IMARPE (Tabla 4). Utilizando el programa STAR, se mapearon el 88.01%, 84.80% y 84.29% de las lecturas pertenecientes a los estadios de 3, 40 y 60 dpe, respectivamente; además se tuvieron lecturas multimapeadas, es decir que coincidían con más de 2 regiones de los supertranscriptos, y lecturas no mapeadas, debido a que no se alinearon a ninguna región (Tabla 5). Por otro lado, utilizando el programa Kallisto, se mapearon el 94.9%, 94.35% y 93.3% de las lecturas pertenecientes a los estadios de 3, 40 y 60 dpe, respectivamente, y se tuvieron lecturas multimapeadas, y lecturas no mapeadas (Tabla 6). Las matrices de expresión obtenidas posteriormente fueron consideradas para el análisis DTE.

Tabla 4. Estadísticos de la construcción de supertranscriptos utilizando el programa TRINITY.

Características de los supertranscriptos	Cantidad
Total de transcriptos	195 512
N50 (pb)	2399
Longitud promedio (pb)	368
Promedio de <i>contigs</i>	948.42
Porcentaje de CG (%)	45.89
Total de bases ensambladas (pb)	97664209

Tabla 5. Mapeo de secuencias realizado con el programa *STAR*.

Característica de las lecturas	Estadio de desarrollo		
	3 dpe	40 dpe	60 dpe
Mapeados únicos	78742534 (88.01 %)	64986519 (84.80%)	75928709 (84.29 %)
Multi-Mapeados	2015190 (2.25 %)	1842663 (2.40%)	2532355 (2.81 %)
No mapeados	8711512 (9.73%)	9808349 (12.80 %)	11613945 (12.89 %)
Total	89469236 (100 %)	76637531 (100 %)	90075009 (100 %)

Tabla 6. Mapeo de secuencias realizado con el programa *Kallisto*.

Características de las lecturas	Estadio de desarrollo		
	3 dpe	40 dpe	60 dpe
Mapeados únicos	78693423 (94.9 %)	64950164 (94.35%)	75885205 (93.34 %)
Multi-Mapeados	4179938 (5.04 %)	3853836 (5.60 %)	5293857 (6.52 %)
No mapeados	51167 (0.06 %)	38003 (0.06 %)	46291 (0.06 %)
Total	82924528 (100 %)	68842003 (100 %)	81225353 (100 %)

7.2. DTE

A partir del análisis de DTE en la comparación por pares, el mayor número de transcriptos sobreexpresados ($p < 0.001$, *fold change* > 4) fue observado entre los estadios 3 y 40 dpe, y estadios 3 y 60 dpe. Además, se observó el mayor número de transcriptos sobreexpresados de la comparación del estadio 3 dpe versus los otros estadios, siendo 1136 en 40 dpe y 1771 en 60 dpe. En la comparación entre los estadios 40 y 60 dpe, se obtuvieron 183 transcriptos expresados diferencialmente, donde 28 se encontraron sobreexpresados a 40 dpe y 155 a 60 dpe) (Tabla 7). Estas diferencias en el número de transcriptos con expresión diferencial observada en las comparaciones entre estadios se visualizan en los gráficos de “*Volcano plot*” (ANEXO, Fig. 11).

Además, la expresión de los transcriptos en los 3 estadios se representó mediante una gráfica “*heatmap*”, donde el color amarillo representa una *región sobreexpresada*, y el morado una *región subexpresada*, en comparación de las otras. De esta forma, se observó una similitud en los perfiles de expresión entre los estadios 40 y 60 dpe, mientras que 3 dpe difiere de los otros dos, existiendo regiones tanto sobreexpresadas como subexpresadas (Fig, 5).

Tabla 7. Transcritos sobreexpresados en cada uno de los estadios, realizando una comparación por pares ($p < 0.001$, fold change > 4). La primera columna representa los estadios de desarrollo evaluados de *P. adspersus*.

Estadios de desarrollo (dpe)	Comparaciones por pares entre estadios de desarrollo		
	3 vs 40	3 vs 60	40 vs 60
3	384	876	-
40	1136	-	28
60	-	1771	155

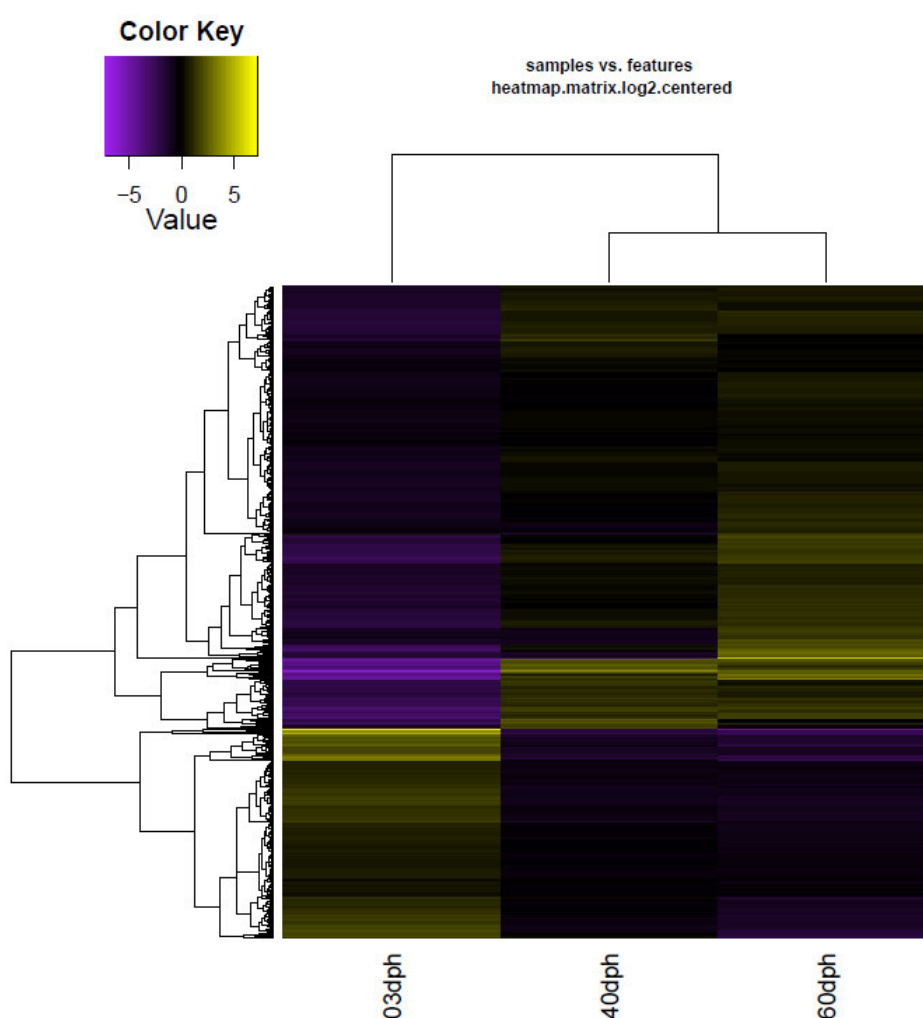


Figura 5. Heatmap de la expresión de transcritos en los 3 estadios de desarrollo de *P. adspersus* (3, 40 y 60 dpe).

7.3. Anotación de transcriptos y enriquecimiento por ontología de genes

A partir de las comparaciones por pares utilizando el paquete de R *dyplr*, se obtuvo una lista de transcriptos sobreexpresados en cada estadio. Así, se observó que la mayor cantidad estuvo presente en la etapa pre-metamórfica de 3 dpe (n=344), seguido por etapa post metamorfosis de 60 dpe (n=144), y la menor cantidad (n=11) durante la etapa final de la metamorfosis en el estadio de 40 dpe (Fig. 6).

A partir de estos seleccionados, se lograron anotar 186 transcriptos que representaron el 54% de total de sobreexpresados en el estadio 3 dpe, 1 transcripto siendo el 9% del total de sobreexpresados en 40 dpe, y 73 transcriptos anotados (50.7%) en el estadio 60 dpe. Sin embargo, algunos de estos anotados correspondían a proteínas no caracterizadas o predichas, por lo que finalmente se obtuvo 183 (53.2 %), 1 (9%) y 41 (28.5%) transcriptos anotados con proteínas caracterizadas, correspondientes a los estadios de 3, 40 y 60 dpe, respectivamente (Tabla 8).

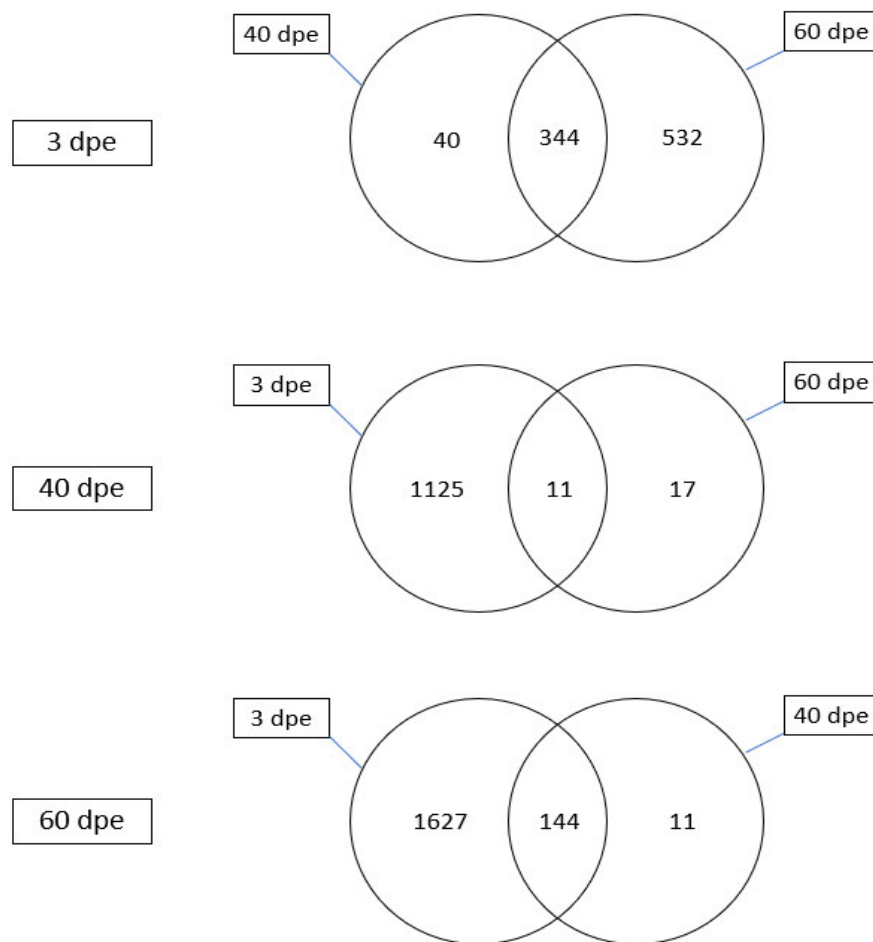


Figura 6. Diagrama de los transcritos sobreexpresados en cada estadio en comparación de los otros dos. La intercepción representa el número de transcritos sobreexpresados en la comparación de ambos estadios.

Tabla 8. Transcripts sobreexpresados en cada estadio. Se puede observar los transcripts que tienen anotación funcional en cada grupo.

Transcriptos sobreexpresados	3 dpe	40 dpe	60 dpe
Total	344	11	144
No anotados	158	10	71
Anotados	186	1	73
Anotados con proteínas caracterizadas	183	1	41
Anotados con proteínas no caracterizadas o hipotéticas	3	0	32

Mediante el análisis de enriquecimiento por ontología de genes a partir de la información obtenida por la anotación, se caracterizaron a los transcripts en las categorías ontológicas de: función molecular, proceso biológico y/o componente celular. Los transcripts pertenecientes a los estadios 3, 40 y 60 dpe se agruparon en 429, 2 y 120 términos ontológicos, respectivamente.

- **Estadio de 3 dpe**

Los 186 transcripts anotados fueron agrupados en las 3 categorías ontológicas (Fig. 7a), presentes en proporción semejante en los GOs (Fig. 8a). En la categoría de función molecular, se categorizaron 157 transcripts, agrupados principalmente en los siguientes niveles ontológicos: 54.3% en unión (GO:0005488), 27.4% en actividad catalítica (GO:0003824), 10.2% en actividad transportadora (GO:0005215), entre otros. En la categoría de proceso biológico, se categorizaron 141 transcripts, los cuales fueron agrupados principalmente en los niveles ontológicos: 55.9% en procesos

celulares (GO: 0009987), 47.8% en procesos metabólicos (GO: 0008152), 38.7% en regulación biológica (GO: 0065007), entre otros. En la categoría de componente celular, se categorizaron 131, los cuales fueron agrupados en los siguientes niveles ontológicos: 44.1% en célula (GO:0005623), 43.5% en parte de la célula (GO:0044464), 37.6% en membrana (GO:0016020), entre otros (Tabla 9).

- **Estadio de 40 dpe**

El único transcripto anotado se agrupó en dos categorías ontológicas, de función molecular y categoría de componente celular, relacionado con la unión (GO: 0005488) y la región extracelular (GO: 0005576), respectivamente (Fig. 8b).

- **Estadio de 60 dpe**

En el estadio de 60 dpe, los 73 transcriptos anotados fueron agrupados en las 3 categorías ontológicas (Fig. 7c). La mayor cantidad de transcriptos caracterizados se observó pertenecer a la categoría de componente celular (Fig. 8c). En la categoría de función molecular, se categorizaron 32 transcriptos, los cuales fueron agrupados en los siguientes niveles ontológicos: 31.5% en actividad catalítica (GO:0003824), 26% en unión (GO:0005488), 5.5% en actividad portadora molecular (GO:0140104), entre otros. En la categoría de proceso biológico, se categorizaron 28 transcriptos, los cuales fueron agrupados en los siguientes niveles ontológicos: 28.8% en proceso metabólico (GO:0008152), 27.4% en proceso celular (GO: 0009987), 9.6% tanto en respuesta a estímulos (GO:0050896) como localización (GO:0051179), entre otros. En la categoría de componente celular, se

categorizaron 60 transcriptos, los cuales fueron agrupados en los siguientes niveles ontológicos: 71.2% en membrana (GO: 0016020), 68.5% en parte de membrana (GO:0044425), 23.3% tanto en parte de la célula (GO:0044464) y célula (GO:0005623), entre otros más (Tabla 10).

- **Comparación entre los estadios**

A partir de la comparación realizada entre todos los estadios, se observó que sólo en la comparación de 3 y 60 dpe presentan niveles ontológicos con diferencias significativa (logaritmo del p-value del Chi cuadrado) entre las 3 categorías (Fig. 9), esto además asociado a la poca cantidad de transcriptos sobreexpresados a 40 dpe (Fig. 10).

Así, de la comparación entre 3 y 60 dpe, en la categoría de función molecular se observaron diferencias significativas en: unión (GO:0005488) perteneciente al nivel 2 de GO (a su vez, existen diferencia significativa en sus subniveles o niveles 3 de GO: unión a drogas (GO: 0008144) y unión a pequeñas moléculas (GO: 0036094)), en actividad transferasa (GO:0016740) perteneciente al nivel 3 de GO (el nivel 2 de GO de este que sería actividad catalítica no presenta diferencia significativa). En la categoría de proceso biológico, en el nivel 2 de GO, se observaron diferencias significativas en: respuesta a estímulo (GO: 0050896), proceso metabólico (GO: 0008152) (a su vez, existen diferencias significativas en sus subniveles o niveles 3 de GO: procesos metabólicos de componentes nitrogenados (GO: 0006807), procesos metabólicos de sustancias orgánicas (GO: 0071704), proceso metabólico primario (GO: 0044238) y regulación del proceso metabólico (GO: 0019222)), proceso celular (GO: 0009987) (a su vez, existen diferencias significativas en su subnivel o nivel 3 de GO: regulación de proceso celular

(GO: 0050794)) y regulación biológica (GO: 0065007). En la categoría de componente celular, en el nivel 2 de GO, se observa diferencia significativa en célula (GO:0005623), parte de la célula (GO:0044464) (a su vez, existe diferencia significativa en su subnivel o nivel 3 de GO: intracelular (GO:0005622)), membrana (GO:0016020), parte de la membrana (GO:0044425) (a su vez, existe diferencia significativa en su subnivel o nivel 3 de GO: componente intrínseco de membrana (GO: 0031224)) y organela (GO: 0043226) (a su vez, existe diferencia significativa en sus subniveles o niveles 3 de GO: organela limitado a la membrana (GO:0043227) y organela intracelular (GO: 0043229)) (Tabla 11).

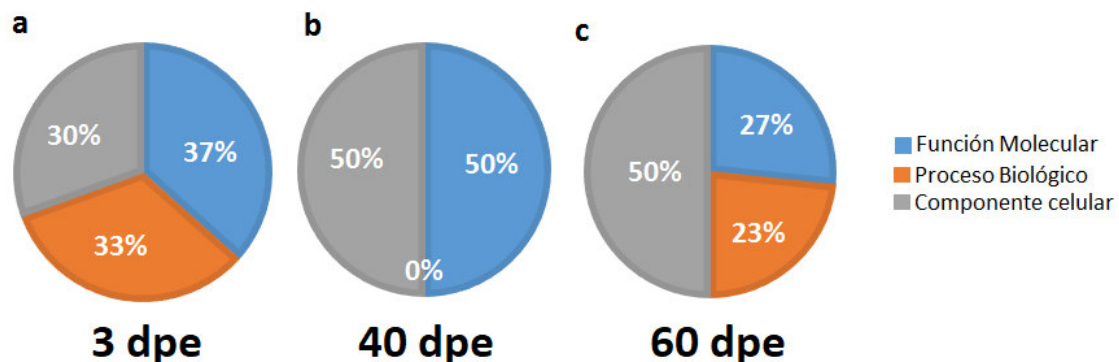


Figura 8. Proporción de las diferentes categorías ontológicas en cada estadio de desarrollo de *P. adspersus*: a) 3 dpe, b) 40 dpe, y c) 60 dpe.

Tabla 9. Lista resumen de las categorías ontológicas en el estadio de 3 dpe de *P. adspersus*. Se observa el GO ID con su nombre, cantidad de genes y porcentajes respectivos.

Término GO	Nombre del término	Número de genes	Porcentajes (%)
Función Molecular			
0005488	Unión	101	54.3
0003824	Actividad catalítica	51	27.4
0005215	Actividad del transportador	19	10.2
0060089	Actividad transductor molecular	14	7.5
0005198	Actividad estructural molecular	10	5.4
0140110	Actividad del regulador de transcripción	10	5.4
0098772	Regulador de la función molecular	7	3.8
0038024	Actividad del receptor de carga	3	1.6
0016209	Actividad antioxidante	1	0.5
0000989	Actividad del factor de transcripción	1	0.5
Proceso Biológicos			
0009987	Proceso celular	104	55.9
0008152	Proceso metabólico	89	47.8
0065007	Regulación biológica	72	38.7

0050789	Regulación del proceso biológico	66	35.5
0050896	Respuesta al estímulo	41	22
0032501	Proceso de organismo multicelular	41	22
0051179	Localización	35	18.8
0032502	Proceso de desarrollo	33	17.7
0023052	Señalización	33	17.7
0071840	Organización de componentes celulares o biogénesis.	22	11.8
0040011	Locomoción	6	3.2
0002376	Proceso del sistema inmune	3	1.6
0022610	Adhesión biológica	3	1.6
0040007	Crecimiento	3	1.6
0043473	Pigmentación	2	1.1
0006118	Transporte de electrones obsoletos	2	1.1
0000003	Reproducción	1	0.5
0051704	Proceso multiorganismo	1	0.5
0007610	Comportamiento	1	0.5
0098754	Desintoxicación	1	0.5

Componente Celular

0005623	Célula	82	44.1
0044464	Parte celular	81	43.5
0016020	Membrana	70	37.6
0044425	Parte de la membrana	68	36.6
0043226	Orgánulo	61	32.8
0044422	Parte del orgánulo	27	14.5
0032991	Complejo que contiene proteínas	25	13.4
0099080	Complejo supramolecular	12	6.5
0005576	Región extracelular	9	4.8
0030054	Unión celular	4	2.2
0044421	Parte de la región extracelular	4	2.2
0045202	Sinapsis	3	1.6
0031974	Lumen encerrado en membrana	1	0.5
0019012	Virión	1	0.5

Tabla 10. Lista de resumen de las categorías ontológicas en el estadio de 60 dpe de *P. adspersus*. Se observa el GO ID con su nombre, cantidad de genes y porcentajes respectivos.

Término GO	Nombre del término	Número de genes	Porcentajes (%)
Función Molecular			
0003824	Actividad catalítica	23	31.5
0005488	Unión	19	26
0140104	Actividad portadora molecular	4	5.5
0005198	Actividad estructural molecular	2	2.7
0005215	Actividad del transportador	1	1.4
0098772	Regulador de la función molecular	1	1.4
0016209	Actividad antioxidante	1	1.4
Proceso Biológicos			
0008152	Proceso metabólico	21	28.8
0009987	Proceso celular	20	27.4
0050896	Respuesta al estímulo	7	9.6
0051179	Localización	7	9.6
0065007	Regulación biológica	6	8.2
0050789	Regulación del proceso biológico	5	6.8
0071840	Organización de componentes celulares o biogénesis.	2	2.7
0032502	Proceso de desarrollo	2	2.7
0051704	Proceso multiorganismo	2	2.7
0040011	Locomoción	1	1.4
0032501	Proceso de organismo multicelular	1	1.4
0048518	Regulación positiva del proceso biológico.	1	1.4
0006804	Reacción de peroxidasa obsoleta	1	1.4
0098754	Desintoxicación	1	1.4
0042967	Proceso biosintético obsoleto acilo-portador-proteína.	1	1.4
Componente Celular			
0016020	Membrana	52	71.2
0044425	Parte de la membrana	50	68.5
0044464	Parte celular	17	23.3
0005623	Célula	17	23.3
0032991	Complejo que contiene proteínas	11	15.1
0043226	Orgánulo	7	9.6
0044422	Parte del orgánulo	2	2.7
0099080	Complejo supramolecular	1	1.4
0030054	Unión celular	1	1.4
0044217	Otra parte del organismo	1	1.4

Tabla 11. Lista de niveles ontológicos con diferencia significativa de las categorías ontológicas en la comparación entre los estadios 3 y 60 dpe de *P. adspersus*, se observa el GO ID con su respectivo nombre, la relación de genes, porcentajes, Valor *p* de la prueba de Chi cuadrado.

Término GO	Nombre del término	Relación de genes (3 dpe – 60 dpe)	Porcentajes (%)	Valor <i>p</i>
Función Molecular				
0005488	Unión	101 - 19	54.3 - 26.0	<0.001
0008144	vinculante de drogas	11 - 10	5.9 - 13.7	0.039
0036094	unión de moléculas pequeñas	13 - 12	7.0 - 16.4	0.021
0016740	actividad transferasa	10 - 13	5.4 - 17.8	0.002
Procesos Biológicos				
0050896	Respuesta al estímulo	41 - 07	22.0 - 9.6	0.02
0008152	Proceso metabólico	89 -21	47.8 - 28.8	0.005
0006807	Compuesto metabólico de nitrógeno proceso metabólico	75 -19	40.3 - 26.0	0.031
0071704	Sustancia metabólica proceso orgánico	81 -19	43.5 - 26.0	0.009
0044238	Proceso metabólico primario	78 -18	41.9 - 24.7	0.01
0019222	Regulación del proceso metabólico.	35 - 05	18.8 - 6.8	0.016
0009987	Proceso celular	104 - 20	55.9 - 27.4	<0.001
0050794	Regulación del proceso celular	64 - 05	34.4 - 6.8	<0.001
0065007	Regulación biológica	72 - 06	38.7 - 8.2	<0.001
0050789	Regulación del proceso biológico	66 - 05	35.5 - 6.8	<0.001
Componente Celular				
0005623	Célula	82 - 17	44.1 - 23.3	0.002
0044464	Parte celular	81 - 17	43.5 - 23.3	0.002
0005622	Intracelular	71 -16	38.2 - 21.9	0.013
0016020	Membrana	70 - 52	37.6 - 71.2	<0.001
0044425	Parte de la membrana	68 - 50	36.6 - 68.5	<0.001
0031224	Componente intrínseco de la membrana	68 - 49	36.6 - 67.1	<0.001
0043226	Organela	61 -07	32.8 - 9.6	<0.001
0043227	Orgánulo limitado a la membrana	42 -06	22.6 - 8.2	0.007

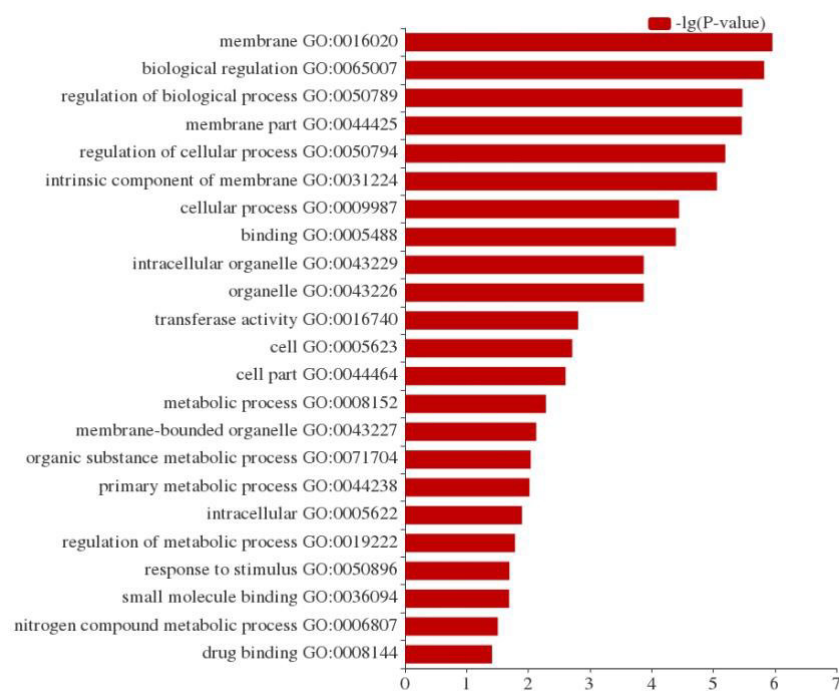
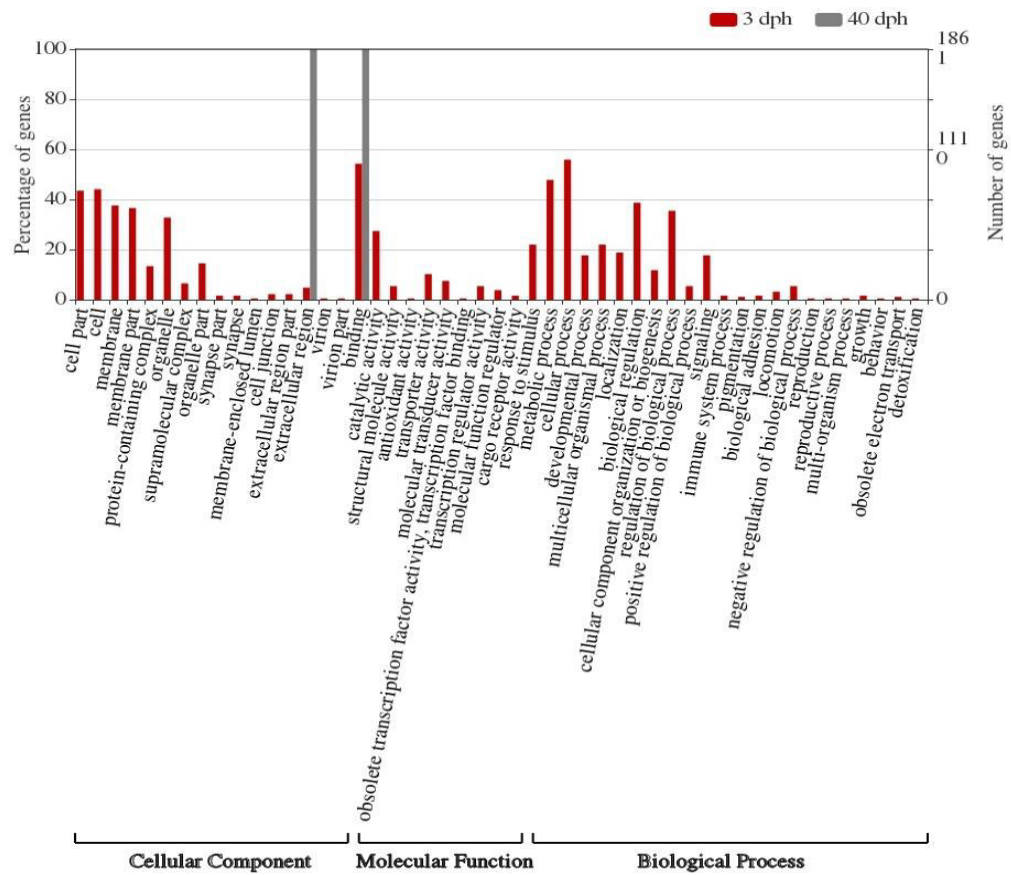
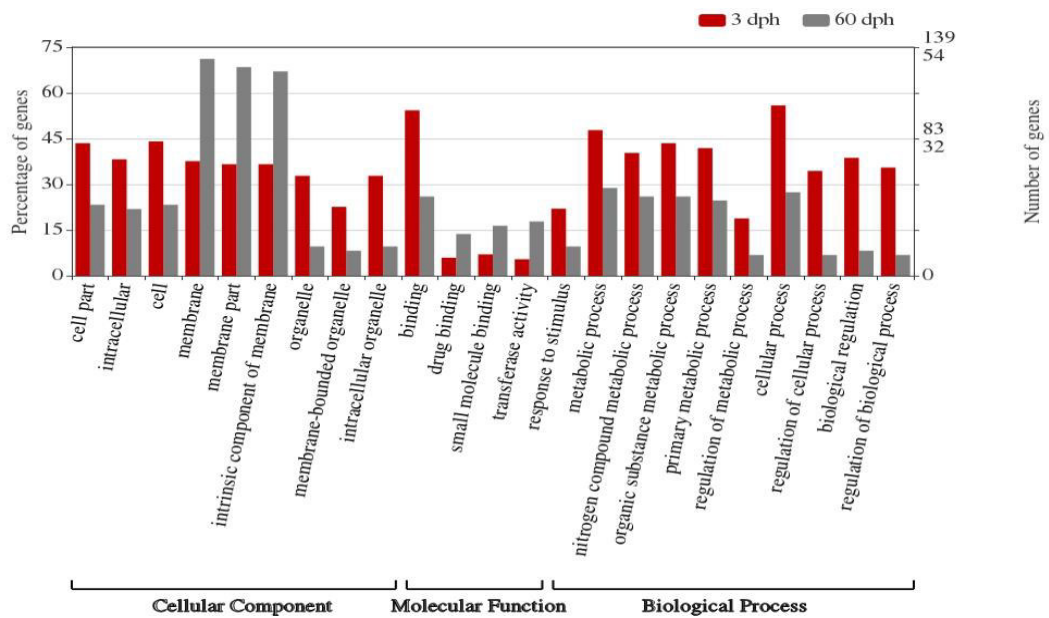


Figura 9. Histograma de los niveles ontológicos con diferencias significativas entre los estadios de 3 y 60 dpe de *Paralichthys adspersus*. $-\lg(P\text{-value})$: logaritmo negativo del p-value de la prueba de Chi cuadrado.

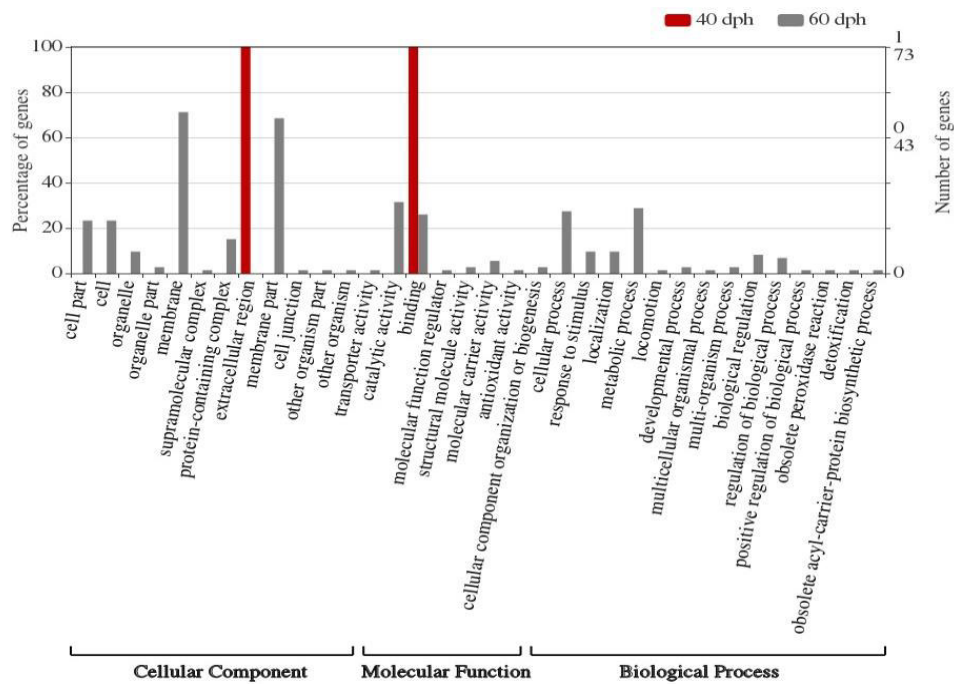
a)



b)



c)



d)

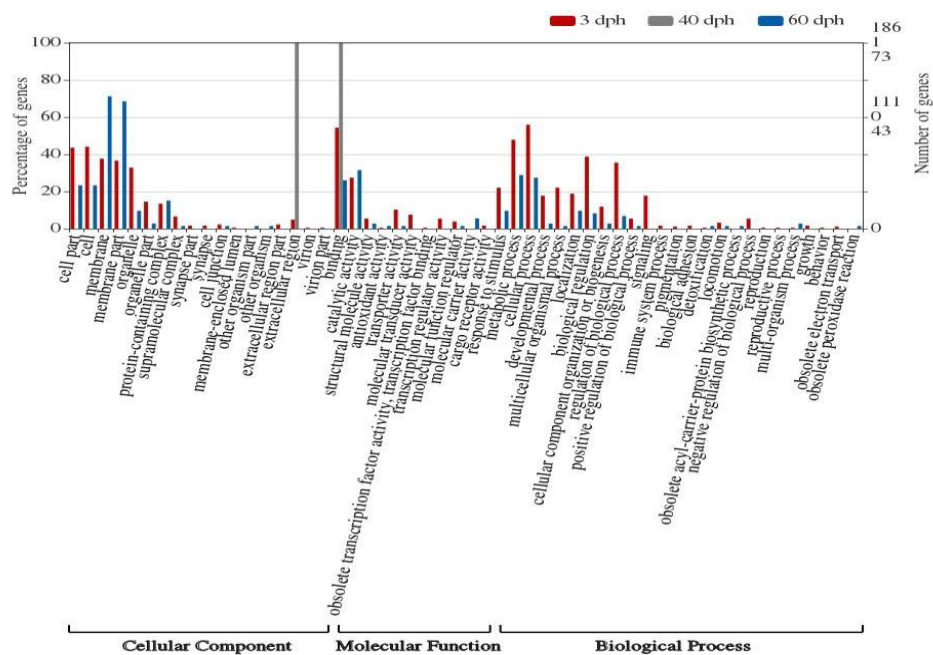


Figura 10. Histograma de la comparación de las cantidades y porcentajes de genes involucrados en los niveles ontológicos con diferencia significativa de las 3 categorías ontológicas entre los estadios de (a) 3 dpe y 40 dpe, (b) 3 dpe y 60 dpe, (c) 40 dpe y 60 dpe, (d) 3, 40 y 60 dpe, de *Paralichthys adspersus*.

7.3.1. Caracterización e identificación de genes relacionados al desarrollo

En el estadio de 3 dpe, de los 186 genes anotados y enriquecidos, se caracterizaron 85 transcriptos (aquellos transcriptos que están clasificados en las 3 categorías ontológicas), parcialmente 56 transcriptos (aquellos transcriptos que tienen solo 2 categorías ontológicas pero no en la categoría de proceso biológico) y no se caracterizaron 45 transcriptos (aquellos transcriptos que tienen clasificado en 1 categoría ontológica pero no en la categoría de proceso biológico). En estadio de 40 dpe, del único gen anotado y enriquecido, se caracterizó parcialmente el transcripto. En el estadio de 60 dpe, de los 73 transcriptos, se caracterizaron 18 transcriptos, parcialmente 12 transcriptos, y no se caracterizaron 43 transcriptos (Tabla 12).

Con los datos obtenidos del servidor WEGO, se identificaron 33, 0 y 2 genes relacionados al desarrollo en los estadios de 3, 40 y 60 dpe, respectivamente (Tabla 13). Los genes identificados están involucrados en diversos procesos biológicos como la formación de los sistemas cardiovascular, nervioso, muscular, digestivo, visual, diferenciación celular, entre otros (Tablas 14 y 15).

Tabla 12. Resumen de la caracterización de genes correspondientes a cada estadio de desarrollo temprano de *Paralichthys adspersus*.

Estado de caracterización	Estadios			Total
	3 dpe	40 dpe	60 dpe	
Caracterizados	85	0	18	103
Caracterizados parcialmente	56	1	12	69
No caracterizados	45	0	43	88
Total	186	1	73	260

Tabla 13. Resumen de identificación de genes relacionados con el desarrollo correspondiente a cada estadio de desarrollo temprano de *Paralichthys adspersus*.

Estado de caracterización	Estadios			
	3 dpe	40 dpe	60 dpe	Total
Caracterizados	27	0	1	28
Caracterizados parcialmente	3	0	1	4
No caracterizados	3	0	0	3
Total	33	0	2	35

Tabla 14. Lista de genes anotados relacionados al desarrollo en el estadio de 3 dpe de *Paralichthys adspersus*.

ID del transcripto	Descripción del gen	3 vs 40 Fold Change (valor p)	3 vs 60 Fold Change (valor p)	Proceso biológico involucrado
TRINITY_DN19417_c0_g1	nephronectin-like	1400.76 (9.36E-20)	385.64 (3.70E-18)	Formación de trabéculas cardíacas, desarrollo de la válvula atrioventricular
TRINITY_DN19303_c1_g1	Actinodin2	199.57 (2.14E-18)	828.19 (3.03E-24)	Desarrollo del cartílago, desarrollo de las aletas.
TRINITY_DN21973_c0_g1	cone cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit alpha'-like	517.57 (1.28E-17)	1008.51 (2.67E-18)	Morfogénesis de retina embrionaria en ojo tipo cámara
TRINITY_DN19038_c0_g1	parathyroid hormone	3316.62 (3.61E-15)	113.74 (2.71E-12)	Diferenciación de células epidérmicas
TRINITY_DN17457_c0_g1	deoxyhypusine synthase	72.55 (4.33E-14)	214.1 (1.41E-18)	Desarrollo del páncreas exocrino, desarrollo de células pancreáticas tipo B
TRINITY_DN21880_c0_g1	protogenin B-like	113.57 (7.06E-14)	265.97 (7.43E-16)	Desarrollo del organismo multicelular
TRINITY_DN20315_c2_g5	homeobox protein CDX-4	204.28 (1.10E-13)	4172.68 (3.80E-16)	Hemopoyesis, somitogénesis, morfogénesis del embrión anterior, formación del límite de la médula espinal posterior del cerebro, desarrollo de pronefrosos, desarrollo del páncreas, especificación del eje anterior / posterior, morfogénesis post-anal de la cola
TRINITY_DN23382_c0_g1	dipeptidase 2-like	17.87 (2.22E-08)	110.77 (8.89E-16)	Crecimiento del desarrollo
TRINITY_DN26742_c0_g1	homeobox protein orthopedia isoform X2	21.01 (2.64E-08)	61.31 (1.60E-11)	Desarrollo del organismo multicelular

TRINITY_DN25531_c0_g1	apolipoprotein D-like	14.96 (1.02E-07)	8.2 (1.68E-05)	Envejecimiento
TRINITY_DN27457_c1_g1	hepatic leukemia factor-like isoform X2	22.96 (1.10E-07)	12.61 (3.86E-06)	Desarrollo del organismo multicelular
TRINITY_DN16680_c0_g1	pancreas transcription factor 1 subunit alpha	25.23 (1.56E-07)	19.45 (5.02E-07)	Diferenciación de células amacrinas, desarrollo del páncreas exocrino, morfogénesis de órganos animales.
TRINITY_DN18908_c0_g1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1- like isoform X1	13.68 (2.37E-07)	9.4 (5.61E-06)	Diferenciación de células del músculo esquelético, desarrollo de la aorta.
TRINITY_DN17740_c0_g2	forkhead box protein B1-like	17.13 (2.70E-07)	73.06 (3.59E-11)	Migración celular al telencéfalo, migración celular en el diencéfalo, migración celular en el hipotálamo, reconocimiento de objetivos de axones, somitogénesis, desarrollo de la placa del piso, desarrollo del colículo inferior, desarrollo del tracto axonal mamilotalámico
TRINITY_DN20294_c2_g3	homeobox protein Hox-B1	14.59 (7.85E-07)	20.23 (8.70E-08)	Desarrollo del organismo multicelular
TRINITY_DN27681_c1_g2	paired box protein Pax-3-like	12.98 (8.23E-07)	34.75 (4.39E-10)	Migración de células de la cresta neural, diferenciación de xantóforos, desarrollo del sistema nervioso entérico
TRINITY_DN17964_c0_g2	caprin-2-like isoform X1	18.57 (1.09E-06)	22.12 (2.53E-07)	Regulación positiva de la vía de señalización Wnt canónica, regulación positiva de la vía de señalización Wnt involucrada en la especificación del eje dorsal / ventral
TRINITY_DN12975_c0_g1	salmon-type gonadotropin-	13.73 (1.33E-06)	29.5 (8.57E-09)	Desarrollo del organismo multicelular

	releasing hormone precursor			
TRINITY_DN20423_c0_g1	WNT1-inducible-signaling pathway protein 3	11.26 (1.57E-06)	14.14 (2.37E-07)	Regulación del crecimiento celular, desarrollo del cartílago, formación de patrón dorsal / ventral.
TRINITY_DN27730_c2_g1	serine/threonine-protein kinase D1-like	12.87 (1.84E-06)	25.14 (2.12E-08)	Regulación de la linfangiogénesis, regulación de la angiogénesis,
TRINITY_DN17887_c0_g2	homeobox protein Hox-B13a	11.63 (1.87E-06)	15.03 (2.68E-07)	Desarrollo del organismo multicelular
TRINITY_DN22541_c2_g1	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM71	10.14 (3.15E-06)	17.08 (3.63E-08)	Morfogénesis del cuerpo embrionario
TRINITY_DN19957_c0_g2	hepatocyte nuclear factor 3-beta-like	10.03 (3.47E-06)	18.96 (1.44E-08)	Diferenciación celular, desarrollo de la placa del piso, desarrollo del cerebro, desarrollo de la glándula de incubación, placa neural anterior / posterior regionalización, morfogénesis del mesodermo axial
TRINITY_DN13230_c0_g1	laminin subunit alpha-1	11.9 (4.28E-06)	9.27 (2.38E-05)	Regulación del desarrollo embrionario.
TRINITY_DN23293_c0_g2	homeobox protein OTX1 B	10.46 (4.47E-06)	53.16 (1.77E-11)	Morfogénesis del oído interno, desarrollo del epitelio pigmentario de la retina, desarrollo del canal semicircular lateral
TRINITY_DN23401_c0_g1	formin-like protein 1	9.92 (4.58E-06)	30.87 (3.46E-10)	Regulación de la forma celular
TRINITY_DN15960_c0_g1	homeobox protein orthopedia B-like isoform X1	10 (6.54E-06)	24.5 (8.11E-09)	Desarrollo del organismo multicelular
TRINITY_DN21873_c2_g1	LIM/homeobox protein Lhx5	9.56 (8.14E-06)	31.49 (6.22E-10)	Desarrollo del cerebro anterior, desarrollo de los ojos

TRINITY_DN5209_c0_g1	neurogenin-1-like	11.16 (1.39E-05)	135.39 (5.80E-10)	Regulación negativa de la neurogénesis, regulación positiva de la diferenciación de las neuronas, desarrollo de las neuronas del cerebro anterior, desarrollo de las neuronas del sistema nervioso periférico, desarrollo del bulbo olfativo, morfogénesis del cerebro posterior, desarrollo de la médula espinal dorsal, desarrollo del nervio de la línea lateral posterior, desarrollo del nervio de la línea lateral anterior, desarrollo del neuromasto
TRINITY_DN20294_c2_g9	homeobox protein Hox-B6b	11.52 (2.06E-05)	50.99 (4.31E-08)	Desarrollo del organismo multicelular
TRINITY_DN21655_c2_g4	homeobox protein Nkx-6.1	10.55 (2.70E-05)	9.27 (5.42E-05)	Regulación de la extensión del axón, migración neuronal, compromiso del destino celular, diferenciación de las neuronas motoras de la médula espinal, diferenciación de las células pancreáticas A, diferenciación de las células pancreáticas de tipo B
TRINITY_DN24570_c1_g3	adenylate cyclase type 8 isoform X1	8.08 (3.09E-05)	21.21 (1.65E-08)	Célula axinal del ganglio retiniano, reconocimiento de punto de elección en la línea media del axón
TRINITY_DN17999_c0_g1	paired box protein Pax-8 isoform X1	8.43 (3.23E-05)	11.09 (4.51E-06)	Formación de placidos óticos, desarrollo del sistema nervioso periférico, especificación de patrón anterior / posterior involucrada en el desarrollo de pronefrosos

Tabla 15. Lista de genes anotados relacionados al desarrollo en el estadio de 60 dpe.

ID del transcripto	Descripción del gen	3 vs 60	40 vs 60	Proceso biológico involucrado
		Fold Change (p-value)	Fold Change (p-value)	
TRINITY_DN23416_c1_g2	actin	939.80 (5.07E-10)	31.28 (3.6E-07)	Morfogénesis celular
TRINITY_DN22851_c1_g1	Predicted protein	11968.31 (1.23E-20)	36.46 (9.6E-11)	Desarrollo del ojo tipo cámara, desarrollo del cerebelo, formación de patrón dorsal / ventral

8. DISCUSIÓN

P. adspersus es considerada una especie de pez plano candidato para la diversificación de la acuicultura peruana (PRODUCE, 2009; PRODUCE, 2013), sin embargo, el potencial de su cultivo es limitado debido a la alta tasa de mortalidad y las anormalidades en el desarrollo. Aún son poco estudiados de forma integral donde se incluya la caracterización molecular del desarrollo desde la perspectiva básica como aplicada (Silva & Oliva, 2010). Técnicas masivas como RNA-Seq ofrecen grandes ventajas frente a aquellas de la primera generación, dada la cantidad de genes expresados que pueden ser identificados en cierta condición, sin la necesidad de contar con un genoma de referencia; donde además otras técnicas pueden ser complementadas para la validación de los marcadores identificados (Wang et al., 2009).

En el presente estudio, a partir del RNA-Seq obtenidos de individuos de *P. adspersus* durante etapas de pre-, durante, y post-metamorfosis, se obtuvieron un total de 272 186 438 lecturas que, luego de ser filtradas, correspondieron a 256 181 776 lecturas (94.15% de las lecturas iniciales); y posterior al ensamble se llegaron a anotar aproximadamente el 1% de los transcritos. Existen algunos reportes en peces planos, donde también realizaron la comparación de transcriptomas en diferentes etapas del desarrollo, como Alves et al. (2016) quienes a partir de la comparación de transcriptomas de estadios premetamórfico y juveniles de *H. hippoglossus* para la identificación de genes relacionados a la metamorfosis, reportaron 1 556 954, 1 200 186 y 888 165 lecturas extraído de cabeza, piel y tracto gastrointestinal, respectivamente; posterior al ensamble obtuvieron 90 676, 65 530 y 38 426 contigs, respectivamente, de las cuales anotaron más del 57% en comparación con 4 bases de proteínas no redundantes. Así ellos reportaron aproximadamente 8000 genes expresados diferencialmente en las 5 etapas metamórficas en comparación del transcriptoma de individuos juveniles, teniendo que

solo el 2% aproximadamente de ellos (145 genes) se encontraban relacionados con las hormonas tiroideas (genes de la familia homeobox, forehead, etc), la mayoría de ellos subexpresadas. Dicho estudio sugiere que estos genes desencadenan redes de genes, cascadas de señalización y factores de transcripción, lo que conllevaría a los cambios evidentes en el tejido que se producen durante la metamorfosis.

Por otro lado, Wang et al. (2019) realizaron estudios sobre el transcriptoma de lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* donde compararon individuos tratados con diferentes hormonas tiroideas e individuos control con el fin de comprender los genes relacionados con la pigmentación, ya que una dosis de hormonas tiroideas además de provocar una metamorfosis prematura, también era causante de albinismo en esta especie. Se obtuvieron 24 370 196 y 23 611 632 lecturas que luego del filtrado quedaron 23 714 208 y 22 992 302 lecturas relacionadas a individuos tratados con la hormona triyodotironina y control, respectivamente. Se mapearon el 79.15% y 66.69% de las lecturas obtenidas en el genoma de referencia de *P. olivaceus*, respectivamente. Por último, se obtuvieron 146 genes expresados diferencialmente (46 sobreexpresadas y 100 subexpresadas) relacionados con la pigmentación, lo que sugiere que las hormonas tiroideas tienen importancia en el proceso de pigmentación en peces planos.

Con respecto a los genes relacionados al desarrollo registrados en este estudio, se resalta la etapa de pre-metamorfosis en *P. adspersus* donde se encontraron la mayor cantidad (n=33) de genes sobreexpresados, respecto a los otros dos estadios evaluados, como: actinodina 2, nefronectina, de la hormona paratiroidea, desoxihipusina sintasa, la proteína 3 de la vía de señalización inducible WNT1, D1 Serina/Treonina quinasa, de la familia PAX de factores de transcripción. La sobreexpresión de dichos genes aparentemente se encontraría asociados a la formación de estructuras como por ejemplo del sistema digestivo y los ojos, que ocurre después de la eclosión del embrión

y coincide con el término de la absorción del saco vitelino (Silva & Oliva, 2010; FONDEPES, 2015).

Así por ejemplo, el gen Actinodina 2 (And2), uno de los genes identificados sobreexpresados en estadio 3 dpe según anotación y enriquecimiento por ontología de genes, estaría involucrado en dos procesos biológicos relacionados al desarrollo: el desarrollo del cartílago y de la aleta. Estudios en embriones de pez cebra realizados por Zhang et al. (2010), mencionan que la inhibición doble de genes actinodina 1 (And1) y And2 están asociados a la ausencia de la proteína actinotrichia (fibrilla rígida no mineralizada que mantienen los pliegues de las aletas rectos y guían la migración de las células mesenquimales dentro del pliegue), lo que conlleva a que los individuos presenten pliegues de aletas deteriorados.

Por otro lado, el gen Npnt (Nfronectina) sobreexpresado en el estadio 3 dpe, ha sido reportado en el proceso de formación la trabécula cardíaca y el desarrollo de la válvula atrioventricular. Patra et al. (2011) mencionan que la inhibición de dicho gen en pez cebra ocasiona la formación no adecuada de la valva valvular y la trabeculación, teniendo como consecuencia la mortalidad de más del 85% de individuos en los 7 primeros dpe, considerándolo además como un novedoso regulador ascendente de la señalización Bmp4-Has2 que desempeña un papel crucial en la diferenciación del canal atrioventricular.

Según la anotación y el enriquecimiento por ontología de genes, el gen sobreexpresado de la hormona paratoidea (PTH) estaría involucrado en un proceso biológico relacionado al desarrollo, de la diferenciación de células epidérmicas. Raymond et al. (2015) realizaron estudios en pez cebra donde la reducción de la expresión de PTH1 produjo diversos efectos negativos como la reducción sustancial de la densidad de las células madres epidérmicas, acortamiento de la mandíbula, impedimento del desarrollo de

arcos branquiales y desorganización de los condrocitos en el cartílago. Además, sugieren que los defectos en los peces deficientes de PTH1 fueron ocasionados, al menos en parte, por la supresión del factor de transcripción de células gliales faltantes 2 (gcm2), debido a que los morfantes de PTH1 no expresaron gcm2.

El gen de la proteína desoxihipusina sintasa (DhS), encontrado con sobreexpresión en 3 dpe, ha sido reportado relacionado al desarrollo de células pancreáticas tipo B y páncreas exocrinos. Mastracci et al. (2015) realizaron estudios inhibición de las fenocopias o la eliminación de DhS en pez cebra, afectando a la biosíntesis de poliaminas que son fundamentales en la organogénesis pancreática, ya que la enzima DhS cataliza la modificación postraducciona (hipusinación) del factor de iniciación eucarióticos 5A (eIF5A), la que a su vez impacta en la traducción del ARN mensajero.

Según la anotación y enriquecimiento por ontología de genes, la proteína 3 de la vía de señalización inducible WNT1 (Wisp3) estaría involucrada en 3 procesos biológicos relacionados al desarrollo: regulación del crecimiento celular, desarrollo del cartílago y formación del patrón dorsal/ventral. Nakamura et al. (2007) realizaron estudios en pez cebra donde la sobreexpresión de Wisp3 inhibió la proteína morfogenética ósea (BMP) y la señalización de Wnt en el desarrollo, mientras que la inhibición mediada por morfolidos, afectó el tamaño y la forma del cartílago faríngeo.

Por otro lado, el gen de la proteína D1 Serina/Treonina quinasa (PKD1) estaría involucrado en 2 procesos biológicos relacionados al desarrollo, la regulación de la linfangiogénesis y de la angiogénesis. Hollenbach et al. (2013) realizaron estudios en pez cebra donde el silenciamiento de PKD1 redujo moderadamente la formación de vasos intersomáticos y el vaso dorsal longitudinal anastomótico en lo que respecta a la angiogénesis fisiológica. Además, el silenciamiento de PKD1 dio lugar a una formación

reducida de los linfangioblastos paracordales que sirve como un precursor para el conducto torácico en desarrollo en lo que respecta a la linfangiogénesis.

Los genes sobreexpresados PAX (PAX3 y PAX8) pertenecen a la familia de genes relacionado en la formación de tejidos y órganos durante el desarrollo embrionario. PAX3 (paired box gene 3 o familia PAX de factores de transcripción) ha sido reportado con un papel en la migración de las células neurales, diferenciación de los xantóforos y desarrollo del sistema nervioso entérico. Minchin & Hughes (2008) realizaron estudios en pez cebra donde el silenciamiento de PAX3 dio como resultado una especificación defectuosa del destino de los xantóforos, esto debido a un retraso en la diferenciación de melanoblastos seguida de un aumento significativo en los melanóforos, lo que sugeriría un cambio de destino impulsado por pax3 dentro de un precursor cromatóforo o una célula madre; además demostraron que la expresión de PAX3 precede a la expresión de otras proteínas de la misma familia como PAX7, que si bien, no es imprescindible para la especificación del destino de xantóforos, su silenciamiento si reduciría la pigmentación amarilla en pez cebra; por último, el análisis realizado a otros derivadas de la creta neural revela que en ausencia de PAX3, el sistema nervioso entérico está ablacionado desde su inicio. Por otro lado, PAX8 ha sido reportado con importancia en la formación de la placoda ótica, desarrollo del sistema nervioso periférico y especificación del padrón anterior/posterior involucrado en el desarrollo de pronefros. Padanad & Riley (2011) realizaron estudios en pez cebra donde se demostró que la formación tanto de la placoda ótica que es responsable de la formación del oído interno como de las placodas epibranchiales cercanas que es responsable de los ganglios sensoriales dentro de las fisuras branquiales, se inician mediante la señalización de Fgf y Foxi1 (ya que estos inducen un campo ótico/epibranchial común) y luego la expresión de pax8 y sox3 cooperan sinérgicamente para establecer el destino ótico.

Por otro lado, la no identificación (0 genes durante 40 dpe) y pocos genes (1 gen durante 60 dpe) con sobreexpresión relacionados al desarrollo, estaría asociado a la ausencia en la formación de nuevas estructuras, a la migración y formación de ambos lados del cuerpo del pez. Así, el gen actina sobreexpresado durante el estadio post-metamórfico, estaría relacionado a la morfogénesis celular. Sin embargo, el enriquecimiento por ontología de genes registró otros procesos biológicos asociados a la expresión de dicho gen, como la regulación de la transcripción, iniciación de la replicación del ADN, el proceso biosintético del ADN, respuesta al cAMP, proceso de óxido-reducción, quimiotaxis, fototaxis, fagocitosis, citocinesis mitótica, organización del citoesqueleto y respuesta hiperosmótica.

Finalmente, la lista de genes reportados en este estudio brinda información para ser considerada de base para futuras investigaciones, orientadas a la identificación de posibles marcadores para ser utilizados en programas de selección de organismos de esta especie durante etapas iniciales, así como la identificación del impacto de cambios de parámetros abióticos durante en el desarrollo de la especie, con el fin de obtener mejoras en su producción bajo cautiverio.

9. CONCLUSIONES

- Los estadios metamórfico (40 dpe) y post-metamórfico (60 dpe) de *P. adspersus* poseen una mayor similitud en los perfiles de expresión (asociados a procesos de migración de estructuras), mientras que en pre-metamorfosis (3 dpe) los procesos de sobreexpresión y subexpresión génica los que estarían asociados a la formación de nuevas estructuras.
- El mayor número de transcritos sobreexpresados, en la comparación por pares, ocurre en la etapa pre-metamórfica de 3 dpe (n=344), seguido por la etapa de post metamorfosis a 60 dpe (n=144), y la de menor número durante la etapa final de la metamorfosis a 40 dpe, esto asociado también a lo registrado en términos ontológicos identificados para cada estadio.
- Los genes relacionados con el desarrollo en *P. adspersus* en los estadios de pre-metamórfico (n=33), metamórfico (n=0) y post-metamórfico (n=2) estarían involucrados en la formación del sistema nervioso, sistema óseo, sistema circulatorio, tejido cardíaco, tejido pancreático, tejido muscular, diferenciación de células epiteliales, hematopoyesis, vías de señalización, entre otros.

10. REFERENCIAS

- ALVES, R.; GOMES, A.; STUEBER, K.; TINE, M.; THORNE, M.; SMÁRADÓTTIR, H.; REINHARD, R.; CLARK, M.; RØNNESTAD, I. & POWER, D. M. The transcriptome of metamorphosing flatfish. *BMC genomics*, 2016, vol. 17, no 1, p. 413.
- ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Disponible en: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- BARBOZA R. Planeamiento Estratégico para el Sector Maricultura. [Tesis de Maestría]. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2017.
- BOLGER, A., LOHSE, M. & USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, vol 30, n° 15, p. 2114-2120.
- BRAY, N.; PIMENTEL, H.; MELSTED, P. & PACHTER, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature biotechnology*, 2016, vol. 34, no 5, p. 525.
- CASTRO, R. & BURGOS, R. *Kudoa thyrsithes* (Myxozoa, Multivalvulida) causing "milky condition" in the musculature of *Paralichthys adspersus* (Neopterygii, Pleuronectiformes, (Paralichthyidae) from Chile. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1996, vol. 91, no 2, p. 163-164.
- CERDA, J. & MANCHADO, M. Advances in genomics for flatfish aquaculture. *Genes & nutrition*, 2013, vol. 8, no 1, p. 5.
- CHAMBERS, R. C., WITTING, D. A., & LEWIS, S. J. Detecting critical periods in larval flatfish populations. *Journal of Sea Research*, 2001, vol 45, n° 3-4, p. 231-242.
- DAVIDSON, N., HAWKINS, Anthony D.K. & OSHLACK, Alicia. SuperTranscripts: a data driven reference for analysis and visualization of transcriptomes. *Genome biology*, 2017, vol. 18, n° 1, p. 148.
- DELGADO, I., FUENTES, E., ESCOBAR, S., NAVARRO, C., CORBEAUX, T., REYES, A. E., VERA, M.I., ÁLVAREZ, M. & MOLINA, A. Temporal and spatial

- expression pattern of the myostatin gene during larval and juvenile stages of the Chilean flounder (*Paralichthys adspersus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 151, no 2, p. 197-202.
- DOBIN, A., DAVIS, C.A., SCHLESINGER, F., DRENKOW, J., ZALESKI, J., JHA, S., BATUT, P., CHAISSON, M. & GINGERAS, T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 2013, vol. 29, no 1, p. 15-21.
 - ESCOBAR, S., FUENTES, E. N., POBLETE, E., VALDÉS, J. A., SAFIAN, D., REYES, A. E., ÁLVAREZ, M. & MOLINA, A. Molecular cloning of IGF-1 and IGF-1 receptor and their expression pattern in the Chilean flounder (*Paralichthys adspersus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, vol. 159, no 3, p. 140-147.
 - FAO Fisheries and Aquaculture Department. The State of World Fisheries and Aquaculture (Technical Paper). 2018, 207 pp.
 - FAO Fisheries and Aquaculture Department. World aquaculture 2010 (Technical Paper). 2011, 105 pp
 - FIGUERAS, A., ROBLEDO, D., CORVELO, A., HERMIDA, M., PEREIRO, P., RUBIOLO, J. A., GÓMEZ-GARRIDO, J.; CARRETÉ, L.; BELLO, X.; GUT M.; GUT, I.; MARCET-HOUBEN, M.; FORN-CUNÍ, G.; GALÁN, B.; GARCÍA, L.; ABAL-FABEIRO, J.; PARDO, B.; TABOADA, X.; FERNÁNDEZ, C.; VLASOVA, A.; HERMOSO-PULIDO, A.; GUIGÓ, R.; ÁLVAREZ-DIOS, J.; GÓMEZ-TATO, A.; VIÑAS, A.; MASIDE, X.; GABALDÓN, T.; NOVOA, B.; BOUZA, C.; ALIOTO, T. & MARTÍNEZ P. Whole genome sequencing of turbot (*Scophthalmus maximus*; Pleuronectiformes): a fish adapted to demersal life. *DNA research*, 2016, vol. 23, no 3, p. 181-192.
 - FONDEPES (en línea). Manual para el cultivo de lenguado. 2015, Acceso 27/09/2018.
 - FROESE, R & PAULY, D. FishBase. 2010.
 - FUENTES, E. N., KLING, P., EINARSDOTTIR, I. E., ALVAREZ, M., VALDÉS, J. A.,

- MOLINA, A., & BJÖRNSSON, B. T. Plasma leptin and growth hormone levels in the fine flounder (*Paralichthys adspersus*) increase gradually during fasting and decline rapidly after refeeding. *General and comparative endocrinology*, 2012, vol. 177, no 1, p. 120-127.
- GENTLEMAN, R.C., CAREY, V.J., BATES, D.M., BOLSTAD. B., DETTLING, M., DUDOIT, S., ELLIS, B., GAUTIER, L., GE, Y., GENTRY, J., HORNIK, K., HOTHORN, T., HUBER, W., IACUS, S., IRIZARRY, R., LEISCH, F., LI, C., MAECHLER, M. ROSSINI, A.J., SAWITZKI, G., SMITH, C., SMYTH, G., TIERNEY, L., YANG, J.YH. & ZHANG, J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology*, 2004, vol. 5, no 10, p. R80.
 - GIBSON, R.; NASH, R., GEFFEN, A. & VAN DER VEER, H. Flatfishes: biology and exploitation. *John Wiley & Sons*, 2014.
 - GRABHERR M.G., HAAS B.J., YASSOUR M., LEVIN J.Z., THOMPSON D.A., AMIT I., ADICONIS X., FAN L., RAYCHOWDHURY R., ZENG Q., CHEN Z., MAUCELI E., HACOEN N., GNIRKE A., RHIND N., DI PALMA F., BIRREN B.W., NUSBAUM C., LINDBLAD-TOH K., FRIEDMAN N., REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 2011, vol 29, n°7, p. 644-52. doi: 10.1038/nbt.1883. PubMed PMID: 21572440.
 - HANS, S.; LIU, D. & WESTERFIELD, M. Pax8 and Pax2a function synergistically in otic specification, downstream of the Foxi1 and Dlx3b transcription factors. *Development*, 2004, vol. 131, no 20, p. 5091-5102.
 - HOLLENBACH, M.; STOLL, S.; JÖRGENS, K.; SEUFFERLEIN, T. & KROLL, J. Different regulation of physiological and tumor angiogenesis in zebrafish by protein kinase D1 (PKD1). *PloS one*, 2013, vol. 8, no 7, p. e68033.
 - INFOPES [Internet]. Lima : INFOPES; 2018 [actualizado el 3/01/2018; citado el 23 de Enero del 2019]. Disponible en: <http://tumi.lamolina.edu.pe/infopes/?product=lenguado-paralichthys-adspersus>

- JOHNSTON, I. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, 2006, vol. 209, no 12, p. 2249-2264.
- LIAO, Y., SMYTH, G.K. & SHI, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 2013, vol. 30, no 7, p. 923-930.
- LOURO, B.; MARQUES, J.; MANCHADO, M.; POWER, D. & CAMPINHO, M. Sole head transcriptomics reveals a coordinated developmental program during metamorphosis. *Genomics*, 2019.
- MACKERETH, M.; KWAK, S.; FRITZ, A. & RILEY, B. Zebrafish pax8 is required for otic placode induction and plays a redundant role with Pax2 genes in the maintenance of the otic placode. *Development*, 2005, vol. 132, no 2, p. 371-382.
- MASTRACCI, T.; ROBERTSON, M.; MIRMIRA, R. & ANDERSON, R. Polyamine biosynthesis is critical for growth and differentiation of the pancreas. *Scientific reports*, 2015, vol. 5, p. 13269.
- MEDINA, M., SOTIL, G., FLORES, V. & FERNANDEZ, C., Ocurrencia de escuticociliatosis en el lenguado *Paralichthys adspersus* causado por *Miamiensis avidus*, en Perú. *Revista peruana de biología*, 2016, vol. 23, no 3, p. 261-270.
- MENDEZ, K. N., ZULOAGA, R., VALENZUELA, C. A., BASTIAS-MOLINA, M., MENESES, C., VIZOSO, P., VALDÉS, J.A. & MOLINA, A.. RNA-seq analysis of compensatory growth in the skeletal muscle of fine flounder (*Paralichthys adspersus*). *Aquaculture*, 2018, vol 490, p. 270-280.
- MINCHIN, J. & HUGHES, S. Sequential actions of Pax3 and Pax7 drive xanthophore development in zebrafish neural crest. *Developmental biology*, 2008, vol. 317, no 2, p. 508-522.
- MINPRO. (en línea). ANUARIO ESTADÍSTICO PESQUERO Y ACUÍCOLA 2016. 2017, Acceso 23/01/2019.
- NAKAMURA, Y.; WEIDINGER, G.; LIANG, J.; AQUILLINA, A; TAMAL, K.; MOON, R. & WARMAN, M. The CCN family member Wisp3, mutant in progressive

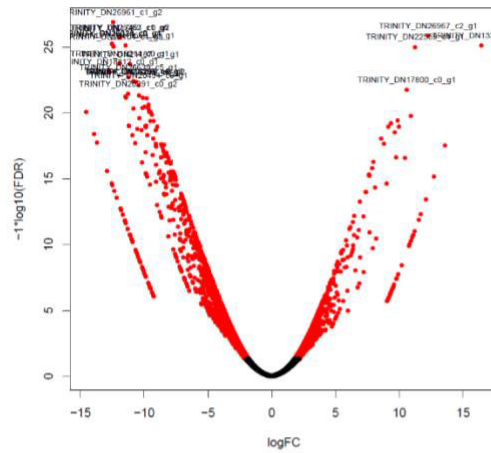
- pseudorheumatoid dysplasia, modulates BMP and Wnt signaling. *The Journal of clinical investigation*, 2007, vol. 117, no 10, p. 3075-3086.
- NAYLOR, R.; PRZEPIORSKI, A.; REN, Q.; YU, J. & DAVIDSON, A. HNF1 β is essential for nephron segmentation during nephrogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(1), 77-87.
 - ORIHUELA L. EVALUACIÓN DE TRES MICRODIETAS EN EL DESTETE DE LENGUADO *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) PARALICHTHYIDAE, EN CONDICIONES DE LABORATORIO. [Tesis de grado]. Lima: Universidad Nacional Federico Villareal. 2015.
 - PADANAD, M. & RILEY, B. Pax2/8 proteins coordinate sequential induction of otic and epibranchial placodes through differential regulation of foxi1, sox3 and fgf24. *Developmental biology*, 2011, vol. 351, no 1, p. 90-98
 - PATRA, C.; DLEHL, F.; FERRAZZI, F.; AMERONGEN, M.; NOVOYATLEVA, T.; SCHAEFER, L.; MUHLFED, C.; JUNGBLIT, B. & ENGEL, F. Nephronectin regulates atrioventricular canal differentiation via Bmp4-Has2 signaling in zebrafish. *Development*, 2011, vol. 138, no 20, p. 4499-4509.
 - PIAGET, N., VEGA, A., SILVA, A. & TOLEDO, P. Effect of the application of-glucans and mannan-oligosaccharides (β G MOS) in an intensive larval rearing system of *Paralichthys adspersus* (Paralichthyidae). *Investigaciones marinas*, 2007, vol. 35, no 2. p. 35-43.
 - POWER, D. M., EINARSDÓTTIR, I. E., PITTMAN, K., SWEENEY, G. E., HILDAHL, J., CAMPINHO, M. A., SILVA, N., SÆLE. Ø., GALAY-BURGOS, M., SMÁRADÓTTIR. H. & BJÖRNSSON, B. T. The molecular and endocrine basis of flatfish metamorphosis. *Reviews in Fisheries Science*, 2008, vol 16, sup 1, p. 95-111.
 - PRODUCE (en línea). Plan Nacional Acuícola 2010-2021. 2009. Acceso 27/09/2018
 - PRODUCE (en línea). Programa Nacional de Ciencia, Desarrollo Tecnológico e Innovación en Acuicultura (C+DT+i) 2013-2021. 2013. Acceso 27/09/2018.

- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. 2013.
- R STUDIO TEAM. RStudio: integrated development for R. 2015
- RAYMOND, W.; KWONG, M. & PERRY, S. An essential role for parathyroid hormone in gill formation and differentiation of ion-transporting cells in developing zebrafish. *Endocrinology*, 2015, vol. 156, no 7, p. 2384-2394.
- ROBINSON, M. D., MCCARTHY, D. J. & SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 2010, vol. 26, no 1, p. 139-140.
- SHAO C.; BAO B.; XIE, Z.; CHEN X.; LI B.; JIA, X.; YAO, Q.; ORTÍ, G.; LI, W.; LI, X.; HAMRE, K.; XU, J.; WANG, L.; CHEN, F.; TIAN, Y.; SCHREIBER, A.; WANG, N.; WEI, F.; ZHANG, J.; DONG, Z.; GAO, L.; GAI, J.; SAKAMOTO, T.; MO, S.; CHEN, W.; SHI, Q.; LI, H.; XIU, Y.; LI, Y.; XU, W.; SHI, Z.; ZHANG, G.; POWER, D.; WANG, Q.; SCHARTL, M. & CHEN, S. The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry. *Nature Genetics*, 2017, vol. 49, no 1, p. 119.
- SILVA, A. & FLORES, H. Consideraciones sobre el desarrollo y crecimiento larval del lenguado (*Paralichthys adspersus*, Steindachner, 1987) cultivado en laboratorio. *Rev. Pacífico Sur*, Número Especial, 1989, p 629-634
- SILVA, A., & OLIVA, M. Revisión sobre aspectos biológicos y de cultivo del lenguado chileno (*Paralichthys adspersus*). *Lat. Amer. J. Aqua. Res.*, 2010, vol 38, n° 3, p. 377-386.
- SMYTH, G. K. "Limma: linear models for microarray data." *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*. Springer, New York, NY, 2005. p. 397-420.
- VENIZELOS, A., & BENETTI, D. D. Pigment abnormalities in flatfish. *Aquaculture*, 1999, vol 176, n° 1-2, p. 181-188
- WANG, N.; WANG, R.; WANG, R. & CHEN, S. RNA-seq and microRNA-seq analysis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae treated by thyroid hormones. *Fish physiology and biochemistry*, 2019, p. 1-12.

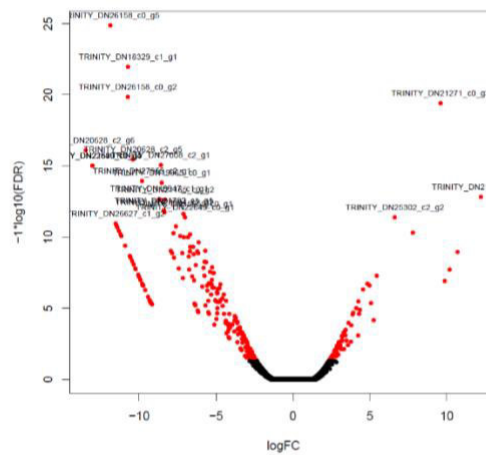
- WANG, Z., GERSTEIN, M., & SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 2009, vol 10, n° 1, p. 57.
- WICKHAM, H., FRANCOIS, R., HENRY, L. & MÜLLER, K. dplyr: A grammar of data manipulation. R package version 0.4, 2015, vol. 3.
- WILSON, R. Dietary effects of n-3 highly unsaturated fatty acid levels on egg and larval quality, and the fatty acid composition of the eggs of Chilean flounder *Paralichthys adspersus* broodstock. *Aquaculture research*, 2009, vol. 40, no 12, p. 1400-1409.
- YE, J.; FANG, L.; ZHENG, H.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; ZHANG, Z.; WANG, J.; LI, S.; LI, R.; BOLUND, L. & WANG, J. WEGO: a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic acids research*, 2006, vol. 34, p. W293-W297.
- ZHANG, J.; WAGH, P.; GUAY, P.; SÁNCHEZ-PULIDO, L.; PADHI, B.; KORZH, V.; ANDRADE-NAVARRO, M. & AKIMENKO, M. Loss of fish actinotrichia proteins and the fin-to-limb transition. *Nature*, 2010, vol. 466, no 7303, p. 234.

11. ANEXO

3 vs 40



40 vs 60



3 vs 60

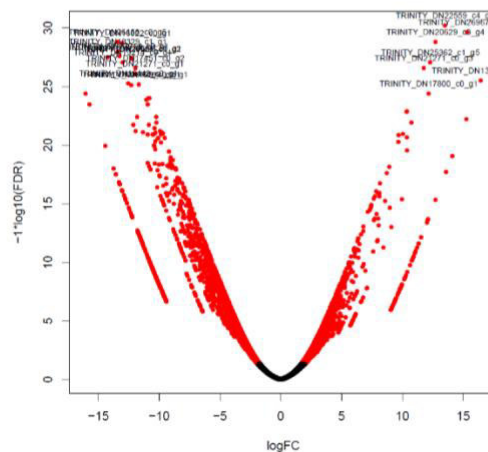


Figura 11. Gráficas de Volcano plot de cada una de las comparaciones por pares de los estadios temprano de desarrollo, los puntos rojos representan los transcritos que cumplen con un valor de Fold Change (FC) mayor a lo establecido en la metodología (>4) y los puntos rojos con nombre representan los transcritos que cumplen tanto con valor de FC como el valor de p-value para que sean significativos (>0.001).